

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Rahel Paloots

**PF14-oligonukleotiid nanopartiklite interaktsioon vereplasma
valkudega ning selle mõju SR-A3 ja SR-A5 retseptorite
translokatsioonile raku pinnal**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias (12 EAP)

Juhendajad MSc Carmen Juks, prof. Margus Pooga

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja

allkiri, kuupäev

TARTU 2016

PF14-oligonukleotiid nanopartiklite interaktsioon vereplasma valkudega ning selle mõju SR-A3 ja SR-A5 retseptorite translokatsioonile raku pinnal

RSPd (rakku sisenevad peptiidid) on efektiivsed transportvektorid, mille abil saab rakku transportida mitmeid lastmolekule. Siiani on arvatud, et RSPd ei vaja rakkudesse sisenemiseks retseptoreid, kuid hiljuti tuvastati, et PF14-oligonukleotiid kompleksid kasutavad püüdur-retseptoreid. Retseptorite ja rakumembraanidega interakteerumisel on oluline ka partiklite ümber moodustuv valgu kroon, mis tekib biokeskkonna valkude adsorbeerumisel partiklitele. Käesolevas töös uuriti, millist mõju avaldab hiire, veise ja inimese seerumis moodustunud valgu kroon SR-A retseptorite translokatsioonil raku pinnale. Selgus, et kõige enam indutseerivad retseptorite pinnaletulekut veise ja inimese seerumis moodustunud biokroon ning kõige vähem hiire seerumiga söötmes inkubeeritud partiklid. Mass-spektromeetria ning konfokaalmikroskoopia tulemusi kombineerides saame ka oletada, millised valgud krooni koostises soodustavad või inhibeerivad partiklite sisenemist rakkudesse ning nende interaktsioone SR-A retseptoritega.

Märksõnad valgu kroon, SR-A retseptorid, rakku sisenevad peptiidid, PF14

CERCS B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

The role of protein corona on the SR-A3 and SR-A5 receptor mediated uptake of PF14-oligonucleotide complexes

Previously, it has been demonstrated that cell penetrating peptides (CPPs) with various cargo molecules are able to penetrate the cell membrane. It has also been shown that some CPPs use scavenger receptors to enter the cells, such as PF14-oligonucleotide particles. When observing nanoparticle interactions with the cell membrane and SR-A receptors, the influence of protein corona that forms around nanoparticles needs to be taken into account. In the current thesis we investigated the effect of various serums on the SR-A mediated uptake of PF14-oligonucleotide complexes. We discovered that protein corona formed in different serums indeed affects the uptake of nanoparticles. We observed that protein corona formed in bovine serum containing medium induced the uptake of the particles the most, whereas the effect of mouse serum was rather modest. By using mass-spectrometry and confocal microscopy, we propose the roles for individual proteins on the uptake of nanoparticles and interactions with SR-A receptors.

Keywords protein corona, SR-A receptors, cell penetrating peptides, PF14

CERCS B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Rakku sisenevad peptiidid	8
1.1.1 Transportaan ja selle analoogid	9
1.1.2 PepFectid	9
1.1.3 RSPde rakku sisenemise mehhanismid	11
1.1.4 Antisense oligonukleotiidide transport RSPde abil	12
1.2 Püüdurretseptorid.....	13
1.2.1 Klass A püüdurretseptorid	14
1.3 Valgu kroon ja selle moodustumise mehhanismid	16
1.3.1 Valgu krooni koostis.....	18
2 EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1 Töö eesmärgid.....	21
2.2 Materjal ja metoodika	21
2.2.1 Rakkude kultiveerimine.....	21
2.2.2 Kasutatud oligonukleotiidid ja RSPd	21
2.2.3 Nanokomplekside formeerimine	21
2.2.4 SDS-PAGE	22
2.2.5 Mass-spektromeetria.....	23
2.2.6 Mass-spektromeetria ja SDS tulemuste analüüs.....	23
2.2.7 Konfokaalmikroskoopia	23

2.2.8	Konfokaalmikroskoopia kvantifikatsioon	24
2.2.9	Kasutatud antikehad	24
2.3	Tulemused.....	25
2.3.1	Inimese, veise ja hiire vereseerumi valkude mõju püüdurretseptorite SR-A3 ja SR-A5 pinnale toomisel PF14-SCO kompleksidega	25
2.3.2	Inimese, veise ja hiire vereseerumiga söötmes tekkinud valgu kroonis esinevad olulisemad valgurühmad ja nende osakaal.	29
2.3.3	Unikaalsed ja ühised valgud kolme erineva seerumiga söötmes tekkinud valgu kroonis.	32
2.3.4	SDS-geelelektroforeesi analüüs inimese, veise ja hiire vereseerumis inkubeeritud PF14-SCO komplekside valgu kroonist	33
2.4	Arutelu	34
	KOKKUVÕTE	42
	SUMMARY	43
	TÄNUAVALDUSED.....	45
	KIRJANDUSE LOETELU.....	46
	Lisa 1. Mass-spektromeetria valkude tabelid	56
	LIHTLITSENTS.....	63

KASUTATUD LÜHENDID

Apo – apolipoproteiin (*apolipoprotein*)

CSR – rakulise stressi vastus (*cellular stress response*)

DAPI – 4',6'-diamidiino-2-fenüülindool (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DOTAP – 1,2-dioleoül-3-trimetüülammoonium propaan (*1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane*)

dPF14 – PepFect14 D-analoog

FBS – veise vereseerum (*fetal bovine serum*)

HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin (*high-density lipoprotein*)

HS – inimese vereseerum (*human blood serum*)

Ig – immunoglobuliin

LDL – madala tihedusega lipoproteiin (*low-density lipoprotein*)

MS – hiire vereseerum (*mouse blood serum*)

PEG – polüetüleen glükool (*polyethylene glycol*)

PF14 – PepFect14

PF32 – PepFect 32

PF6 – PepFect6

pGL3 – lutsiferaasi reptortergeeni sisaldav plasmiid

PMO – fosfomorfoliino oligonukleotiid (*phosphorodiamidate morpholino*)

PNA – polüamiid nukleinhape (*peptide nucleic acid*)

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*)

RSP – rakku sisenevad peptiidid (*cell penetrating peptides*)

SCO – splaissimist korrigeeriv oligonukleotiid (*splice correcting oligonucleotide*)

SDS – naatrium dodetsüül sulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – naatrium dodetsüül sulfaat polüakrüülamiid geelelektroforees (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

siRNA – väike interferents RNA (*short interfering RNA*)

SR-A – püüdurreseptor A klass (*Scavenger receptor class A*)

SR-B – püüdurreseptor B klass (*Scavenger receptor class B*)

sRxR4 – arginiini jääke sisaldav rakku sisenev peptiid

Tat – HIV transkriptsiooni transaktivaator

TP – transpordit (transportin)

TP10 – transportin10 (*transportin10*)

VLDL – väga madala tihedusega lipoproteiin (*very low density lipoprotein*)

SISSEJUHATUS

Valgu kroon (inglise keeles *protein corona*) on valkudest koosnev kest, mis tekib nanopartiklitele nende sattumisel bioloogilisse keskkonda (näiteks vereplasma, vereseerum). Valgu krooni uurimine on oluline nanopartiklite rakendamisel meditsiinis – valgu kroon mõjutab partiklite sisenemist rakkudesse, nende eluiga ning toksilisust organismis.

Valgu krooni koostisest võib leida mitmeid olulisi veres sisalduvaid valgurühmi. Valgu krooni koostises on esindatud nii immunoglobuliinid, koelekke valgud, apolipoproteiinid, komplemendi valgud jms. Selle koostis ei ole täpselt sama, mis ümbritseval keskkonnal, ning sõltub suuresti mitmetest faktoritest, näiteks partikli suuruselt ja pinnalaengust. Biokrooni koostises olevad valgud võivad nii soodustada kui ka takistada nanopartiklite sisenemist rakkudesse, interakteerudes raku plasmamebraani ning mitmete retseptoritega. Lisaks näitavad mõned uuringud, et just seerumivabas keskkonnas inkubeeritud nanopartiklid tungisid rakkudesse kõige edukamalt, olles rakkudele toksilisemad.

Lisaks interaktsioonile rakumembraaniga võivad partiklid sisenemiseks kasutada ka mitmeid retseptoreid. Üheks retseptorite grupiks, mida mõned nanopartiklid võivad rakkudesse sisenemiseks kasutada, on püüdurretseptorite A klassi retseptorid (SR-A). Nende retseptorite ligandideks on negatiivse laenguga osakesed, mis võimaldab nende kasutamist sihtmärgina. Näiteks selles töös kasutatud PF14-oligonukleotiid nanokompleksid on negatiivse laenguga ning on seetõttu võimalised seonduma SR-A retseptoritele. Lisaks on näidatud, et mitmed valgu krooni koostises olevad valgud võivad mõjutada SR-A retseptorite hulka rakkude pinnal. Näiteks apolipoproteiin ApoB100 ja muutunud konformatsiooniga veise seerum albumiin võivad indutseerida SR-A retseptorite pinnaletulekut.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida valgu krooni teket ja koostist PepFect14 ja oligonukleotiidi nanopartiklite inkubeerimisel inimese, veise ja hiire vereseerumiga söötmes. Teise eesmärgina selgitada valgu krooni võimalikku mõju nanopartiklite interaktsioonidel rakkudega ning klass A püüdurretseptoritega.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on lühikesed, 5–40 aminohappejäägi pikkused järjestused, mis on võimelised erinevaid mehhanisme kasutades läbima rakumembraani ja rakku sisenema (Langel, 2006). Esmakordselt kirjeldasid sellisete omadustega valke Frankel ja Pabo 1988. aastal, kui avastasid, et HIV-1st pärinev Tat valk on võimeline läbima rakumembraani (Frankel *et al.*, 1988). Hiljem tehti kindlaks minimaalne järjestus, mis on vajalik rakku sisenemiseks (Vivès *et al.*, 1997). Pärast seda avastasid Joliot ja teised, et *Drosophila Melanogaster*ist eraldatud *Antennapedia* 60-aminohappejäägi pikkune homeodomään on samuti võimeline läbima raku plasmamembraani (Joliot *et al.*, 1991). Minimaalne sisenemiseks vajalik järjestus tehti samuti hiljem kindlaks (Derossi *et al.*, 1994). Lisaks nendele avastustele on oluline ka esimese kimäärse RSP transportaani disainimine. Transportaan on 27-aminohappejäägi pikkune peptiid, mille N-terminaalses otsas on galaniin ning C-terminaalses otsas on herilasemürgist pärinev peptiidne toksiin mastoparaan (Pooga *et al.*, 1998a).

Tänaseks on RSPsid avastatud ja disainitud suurel hulgal ning need võivad olla väga erinevat päritolu. Neid on leitud viiruse valkudest, looma mürkidest ning samuti sünteetiliste peptiidide raamatukogudest (Jallouk *et al.*, 2015). RSPd erinevad üksteisest struktuuri ja omaduste poolest ning seetõttu on olnud neid raske klassifitseerida. Näiteks võib nad jagada päritolu alusel kolme klassi: kimäärsed peptiidid, mis koosnevad kahest erinevast peptiidist; looduslikest valkudest pärinevad peptiidid ning sünteetilised peptiidid (Lindgren *et al.*, 2000). Looduslikest valkudest saadud RSPd võivad pärit olla erineva funktsiooniga valkudest, näiteks transkriptsioonifaktoritest, DNA/RNAGA seonduvatest valkudest jne. Ka eelnevalt mainitud Tat peptiid kuulub selliste RSPde hulka. Kimäärsed peptiidid koosnevad tavaliselt kahest looduslikku päritolu valgust, mida liites saab uute omadustega peptiidi (Langel, 2015), näiteks transportaani (Pooga *et al.*, 1998a). Sünteetiliste valkude hulka kuuluvad kunstlikult loodud peptiidid (Langel, 2015), näiteks polüarginiini järjestused (Wender *et al.*, 2000). Lisaks võib RSPd rühmitada ka nende laengu alusel katioonseteks, amfipaatseteks ja hüdrofoobseteks peptiidideks (Langel, 2015; Jallouk *et al.*, 2015).

1.1.1 Transportaan ja selle analoogid

Transportaan (TP) on kimäärne RSP (Langel, 2015; Jallouk *et al.*, 2015), mis koosneb 27st aminohappest. 12 aminohappejääki TP N-terminaalsest otsast on pärit neuropeptiid galaniinist ning 14 aminohappejääki C-terminaalsest otsast on pärit herilase mürgist mastoparaanist (tabel 1). Need kaks osa on omavahel ühendatud lüsiiniga (Pooga *et al.*, 1998a). Transportaan on efektiivne transportvektor, mille sisenemine rakku toimub kiiresti ega vaja tõenäoliselt sisenemiseks retseptorit (Soomets, *et al.*, 2000). Transportaani abil on rakkudesse edukalt transporditud mitmeid bioaktiivseid molekule, näiteks antisense meetodil toimivat oligonukleotiidi PNAd (Pooga *et al.*, 1998b). Vaatamata transportaani efektiivsusele, ilmnes eksperimentide käigus, et ta inhibeerib membraanides GTPaaside aktiivsust. Seetõttu on selle põhjal hiljem sünteesitud mitmeid lühemaid analooge, et teha kindalaks rakkudesse sisenemiseks vajalik järjestus ning kõrvaldada võimalikud toksilised efektid. Kõige efektiivsemaks osutus transportaani analoog, mille N-terminaalsest otsast oli eemaldatud 6 aminohappejääki, seejuures aga säilis peptiidi võime läbida raku plasmamembraan. See peptiid nimetati transportaan10ks (TP10) (tabel 1) (Soomets *et al.*, 2000) ning selle baasil on edasi arendatud teisigi efektiivseid transportvektoreid.

1.1.2 PepFectid

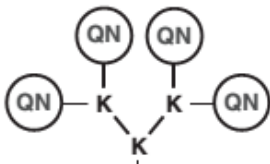
PepFectid on teise põlvkonna transfektsioonireagendid, mis on loodud nukleiinhapete transpordiks rakku (Langel, 2015). Mitmed varasemad uuringud on näidanud, et rasvhappe lisamine võib tõsta transfektsiooni efektiivsust (Tönges *et al.*, 2006; Futaki *et al.*, 2001). On näidatud, et stearüülimine võimaldab DNAd kondenseerida stabiilsetesse partiklitesse ning muudab RSP ja nukleiinhappe vahelised kompleksid hüdrofoobsemaks ning lipofiilsemaks, mis soodustab interaktsioone plasmamembraaniga ning peptiid-lastmolekul kompleksi liikumist rakku (Khalil *et al.*, 2004). Lisaks on näidatud, et RSPde stearüülimine vähendab partiklite tsütotoksilisust ning soodustab nende vabanemist endosoomidest, mis on oluline, et nukleiinhape jõuaks oma sihtmärgini ning saaks avaldada bioloogilist efekti (Tönges *et al.*, 2006). Seda teadmist kasutati ära ka TP10 modifitseerimisel. Stearüülitud TP10 näitas eelnevalt kirjeldatud omadusi: madalamat tsütotoksilisust, endosoomidest vabanemist ning mittekovalentse sidumise võimalikkust (Mäe *et al.*, 2009). Stearüülitud TP10 nimetati PepFect3ks ning seda on kasutatud ka edaspidisteks modifikatsioonideks ja uute peptiidide disainimiseks.

PepFect6 on sarnane PepFect3le, kuid sellele on lisatud triflorometüülkinoliin (*trifluoromethylquinoline*) (tabel 1), mis on klorokviini analoog ning inhibeerib endosoomide hapestumist. See põhjustab endosoomide paisumist ja nende membraanide destabiliseerimist, mis omakorda soodustab endosoomidesse kinnijäänud materjali vabanemist (EL Andaloussi *et al.*, 2011).

PepFect14 (tabel 1) on stearüülitud TP10 edasiarendus, milles on lüsiinide ja isoleutsiinide asemel kasutatud ornitiine ja leutsiine. Positiivse laenguga lüsiinijäägid asendati ornitiinijääkidega nende suurema transduktsiooniefektiivsuse ning parema DNAGA seondumise tõttu, mis võimaldab kasutada väiksemat peptiidi kontsentratsiooni (Ezzat *et al.*, 2011). Võrreldes lüsiini ja leutsiiniga on ornitiinil kõrgem afiinsus DNA suhtes ning seetõttu on võimalik kasutada väiksemaid laengusuhteid (Ramsay ja Gumbleton, 2002). Arvatakse, et kuna ornitiin ei ole tavaline valkude koostises esinev aminohape, on ta vastupidavam proteaaside suhtes (Ezzat *et al.*, 2011).

Lisaks uuriti PepFect14 transfektsiooni efektiivsust võrreldes PepFect3 ja LipofectamineTMiga. PepFect14 ületas mõjususe poolest suuresti PepFect3, kuid stearüülrühma eemaldamisel see efekt kadus. Kui võrrelda kommertsiaalse transfektsiooniagendi LipofectamineTMiga, siis näidati, et SCO-PF14 kompleksid indutseerisid splaissingu aktiivsust kordades efektiivsemalt kui LipofectamineTM (Ezzat *et al.*, 2011).

Tabel 1. Transportaani ja selle analoogide järjestused.

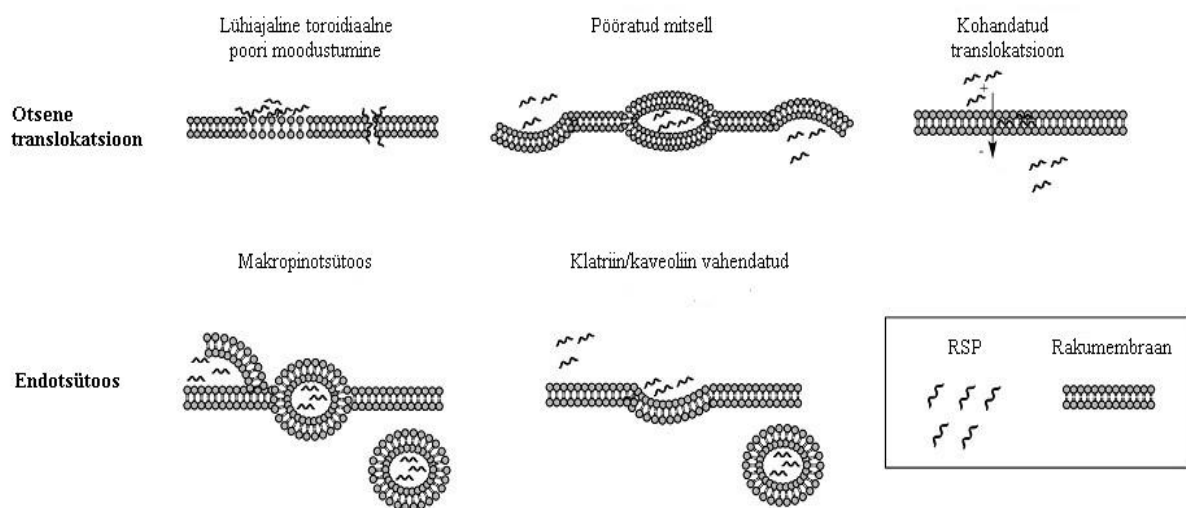
RSP	Järjestus
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL- NH ₂ (Pooga <i>et al.</i> , 1998a)
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂ (Soomets <i>et al.</i> , 2000)
PepFect3	Stearüül- AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂ (Mäe <i>et al.</i> , 2009)
PepFect6	 <p>stearüül- AGYLLGKINLKALAALAKKIL- NH₂</p> <p>(muudetud kujul EL Andaloussi <i>et al.</i>, 2011)</p>
PepFect14	Stearüül- AGYLLGKLLOOLAAAALLOOLL-NH ₂ (Ezzat <i>et al.</i> , 2011)

1.1.3 RSPde rakku sisenemise mehhanismid

Rakkudesse sisenemiseks on RSPd võimelised kasutama mitmeid erinevaid mehhanisme, mis sõltuvad nii RSPst kui ka selle kontsentratsioonist, lastmolekulist või selle puudumisest ja ka rakuliinist (Ramsey ja Flynn, 2015). Samuti mõjutavad RSPde sisenemist eri rakuliinide membraanide iseärasused (Stalmans *et al.*, 2013).

Sisenemise mehhanismide määramine on tekitanud palju vaidlusi ning selle täpne mehhanism pole siiani kindel. Kuna RSPd on enamasti positiivse laenguga, siis arvatakse, et nad interakteeruvad esmalt mõne negatiivselt laetud rakupinna komponendiga, milleks võivad olla raku plasmamembraani koostises olevad suhkrujäägid või fosfolipiidid. Esmane interaktsioon plasmamembraaniga indutseerib nende sisenemise kas otsese translokatsiooni teel või läbi endotsütoosi indutseerimise (Huang *et al.*, 2015).

Otsese translokatsiooni mehhanismidest on välja toodud toroidiaalse poori moodustumise, pööratud mitselli ja adaptiivse translokatsiooni mehhanisme (joonis 1). Peale selle kasutavad RSPd ka endotsütoosiradasid. RSPd võivad sisenemiseks kasutada nii klatriin- kui ka kaveoliin-sõltuvat endotsütoosi ja ka makropinotsütoosi (joonis 1) (Ramsey ja Flynn, 2015). Samuti on võimalik, et RSPd kasutavad sisenemiseks samaaegselt mitmeid erinevaid endotsütoosiradasid (Kaplan *et al.*, 2005). Lisaks võib otsene translokatsioon toimida osana endotsütoosist, kuid selle täpsed mehhanismid pole teada (Pae ja Pooga, 2014).



Joonis 1. RSPde rakku sisenemise mehhanisme kujutav joonis (muudetud kujul Ramsey ja Flynn, 2015).

Kuigi on arvatud, et RSP-lastmolekuli kompleksid ei vaja sisenemiseks spetsiifilist retseptorit, on hiljuti näidatud, et mõned RSP-nukleiinhappe kompleksid vajavad siiski rakkudesse sisenemiseks retseptoreid. PepFect14-SCO nanokomplekside omadusi uurides näidati, et vastupidiselt eeldatule olid moodustunud partiklid negatiivse laenguga. Tänu negatiivsele laengule ei saa sellised partiklid seonduda negatiivselt laetud plasmamembraani komponentidega, kuid ometigi suudavad PF14-SCO kompleksid esile kutsuda efektiivse splaissingu parandamise efekti (Ezzat *et al.*, 2011). Hiljem avastati, et klass A püüdurretseptorid vahendavad selliste partiklite sisenemist rakkudesse (Ezzat *et al.*, 2012). Ka PF14 D-analoog (dPF14) ning sRxR4 sisenevad rakku SR-A3 ja SR-A5 retseptoreid kasutades. Mõlemad RSPd sisenesid rakku SR-A3 ja SR-A5 vahendusel (Lindberg *et al.*, 2015). Lisaks PepFect perekonna RSPdele, kasutavad ka NickFectid oligonukleotiidide rakku transportimiseks SR-A3 ja SR-A5 retseptoreid (Arukuusk *et al.*, 2013).

1.1.4 Antisense oligonukleotiidide transport RSPde abil

Antisense oligonukleotiidid on lühikesed DNA või RNA järjestused, millel on potentsiaal muuta geeniekspressiooni järjestus-spetsiifiliselt (Boisguérin *et al.*, 2015). Oligonukleotiidid on paljutöotavad kandidaadid meditsiinis uute ravimite väljatöötamisel, aga ka näiteks transgeensete organismide saamisel (Huang *et al.*, 2015). Siiski on nende kasutamine piiratud, kuna nende suur molekulmass ning negatiivse laeng takistavad pääsemist rakkudesse.

Erinevate bioaktiivsete molekulide transpordiks rakku oleks võimalik kasutada ka viirusvektoreid, kuid neil on võrreldes RSPdega mitmeid puudusi. Võrreldes viirusvektoritega on RSPd vähem toksilised, vähem immunogeensed ning tõenäosus mutatsioonide tekkeks on väiksem. Samuti on komplekside moodustamine RSPde ja lastmolekulide vahel lihtsam kui viiruspartiklite kokkupanek (Huang *et al.*, 2015).

Oligonukleotiidide transpordiks rakku RSPde vahendusel kasutatakse nii kovalentset kui ka mittekovalentset strateegiat. Kovalentne side nukleiinhappe ja RSP vahel moodustatakse sageli disulfiidsildade, aga ka ester- ja peptiidsideme abil. Kovalentne side on tugev, kuid redutseeriva keskkonnaga tsütoplasmas disulfiidsild laguneb ning peptiid eraldub nukleiinhappest (Margus *et al.*, 2012). Kovalentset strateegiat kasutatakse eelkõige mitte-laetud nukleiinhapete, nagu PMOde ja PNAd sidumiseks RSPde külge (Boisguérin *et al.*, 2015). Mittekovalentne sidumine põhineb elektrostaatilistel ja hüdrofoobsetel interaktsioonidel positiivselt laetud RSP ja negatiivselt laetud nukleiinhappe vahel (Boisguérin *et al.*, 2015; Margus *et al.*, 2012). Võrreldes kovalentse

sidumisega on see meetod lihtsam ning seda saab kasutada väga paljude erinevate lastmolekulidega nende funktsionaalsust mõjutamata (Huang *et al.*, 2015).

Nii kovalentset kui ka mittekovalentset strateegiat kasutades on rakku transporditud mitmeid erinevaid lastmolekule, sealhulgas siRNAid, splaissingut korrigeerivad oligonukleotiidid, plasmiidset DNAd, valke, ravimeid jms (Wang *et al.*, 2014). Kuai ja teised kasutasid Tat ja PEG modifikatsioonidega liposoomi ravimite transpordiks vähirakkudesse. Kasutades Tati ja PEG kombinatsioone võimaldati spetsiifiline transport vähirakkudesse (Kuai *et al.*, 2010). Maegawa ja teised näitasid, et transportides c-myc ASO (antisense oligonukleotiid) Tat peptiidi abil rakku, on võimalik pidurdada järjestus-spetsiifiliselt rakkude kasvu (Maegawa *et al.*, 2016). Lisaks on RNA interferents olnud tulemuslik PepFect6 ja siRNA komplekside transpordil mitmetesse rakuliinidesse. Nende katsete tulemusena selgus, et PF6 ja siRNA kompleksid vabanesid edukalt endosoomidest ning takistasid sihtmärk-RNA translatsiooni mitmetes rakutüüpides (EL Andaloussi *et al.*, 2011). RSPsid on proovitud rakendada ka näiteks Duchenne'i lihasdüstroofia raviks. Lehto ja teised näitasid hiirtes edukat eksoni väljalõikamist Pip6a-PMO konjugaatide abil (Lehto *et al.*, 2014).

1.2 Püüdurretseptorid

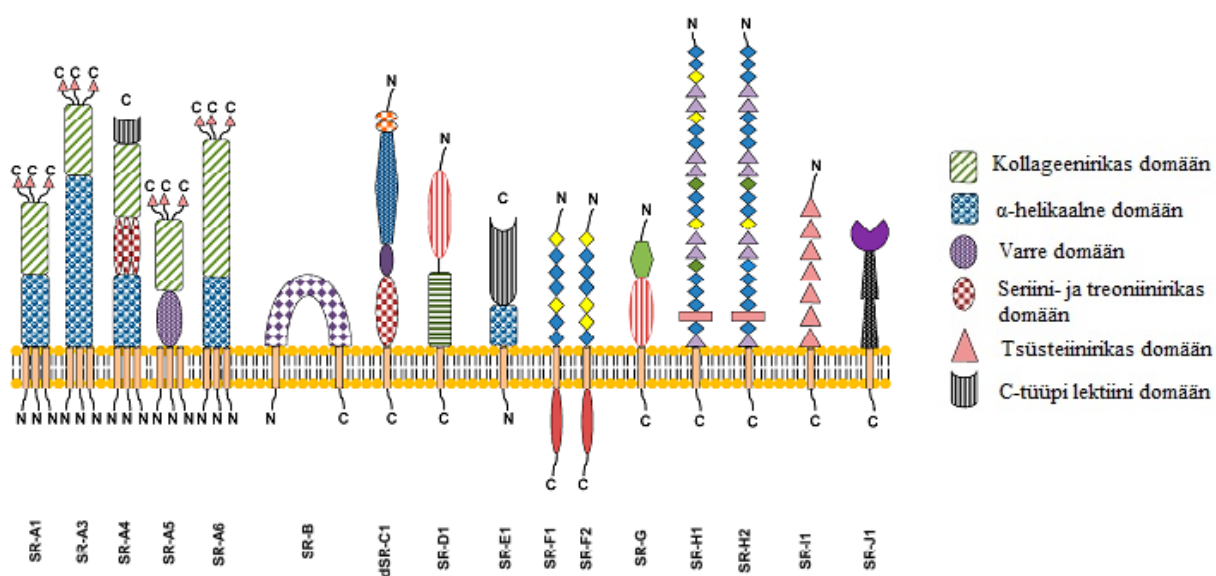
Püüdurretseptorid (inglise keeles *scavenger receptors*) on suur membraaniseoseliste retseptorite perekond, mis on võimelised siduma modifitseeritud LDL (*low density lipoprotein*) partikleid (Zani *et al.*, 2015). Goldstein ja teised avastasid püüdurretseptorid 1979. aastal, kui uurisid ateroskleroosi. Nad avastasid, et makrofaagidel esinev püüdurretseptor on võimeline siduma atsetüleeritud või oksüdeeritud LDL partikleid ning need rakkudesse endotsüteerima (Goldstein *et al.*, 1979). Tänapäevaks on leitud püüdurretseptorite hulk oluliselt suurem ning vaatamata struktuursetele erinevustele (PrabhuDas *et al.*, 2014), on need sarnased oma funktsioonilt siduda negatiivse laenguga ligande (Fogelman *et al.*, 1981).

Selgema ülevaate jaoks on neid üritatud ka klassifitseerida. Grupeerimisele pani alguse Dr. Krieger, kes jagas retseptorid esialgu geenijärjestuse alusel klassidesse ning seejärel alternatiivse splaissingu alusel omakorda tüüpideks (Krieger, 1997). Hiljuti on seda nomenklatuuri korrastatud ning selle järgi jaguneb see retseptorite superperekond kümnesse klassi, tähistustega A-J (PrabhuDas *et al.*, 2014).

Püüdurretseptorid toimivad mitmete mehhanismide abil, kasutades nii endotsütoosi kui ka fagotsütoosi, et eemaldada lagundatud või kahjulikud ained. Tänapäevaks on kindlaks tehtud suur hulk erinevaid püüdurretseptoreid, mis esinevad lisaks makrofaagidele ka teistelgi rakkudel, näiteks epiteelirakkudes, kopsudes, platsentas ja ka südames, ning on võimelised seonduma paljude erinevate molekulidega (PrabhuDas *et al.*, 2014). Peale modifitseeritud LDL-partiklite on püüdurretseptorid võimelised siduma ka mitmeid teisi ligande, näiteks endogeenseid valke ja lipoproteiine ning mikroobseid komponente, sealhulgas lipopolüsahhariide ja lipoteihhuhappeid (Canton *et al.*, 2013). Lisaks on püüdurretseptorite ligandide ühiseks omaduseks sageli ka nende negatiivne laeng (Fogelman *et al.*, 1981).

1.2.1 Klass A püüdurretseptorid

SR-A retseptorid kuuluvad püüdurretseptorite hulka, A klassi. Need on membraanivalgud, mis koosnevad 400–500 aminohappest (Zani *et al.*, 2015). Kõik viis A klassi kuuluvat püüdurretseptorit (SR-A1–SR-A6) on homotrimeersed transmembraansed valgud (Kelley *et al.*, 2014). Kõigil nendel retseptoritel on tsütoplasmaatiline, transmembraanne ja kollageeni domään. Mõnedel A klassi püüdurretseptoritel on lisaks ka α -helikaalne, tsüsteiinirikas ja varre domään (joonis 2) (PrabhuDas *et al.*, 2014). Kollageense domääni pikkus on SR-A retseptoritel erineva pikkusega, varieerudes 75st kuni 250 aminohapteni (Whelan *et al.*, 2012).



Joonis 2. Püüdurretseptorite struktuur – joonisel on näidatud igale retseptorile omased domäänid. Legendis on toodud vaid A-klassi retseptoritele omased domäänid (muudetud kujul Zani *et al.*, 2015).

Nagu teisedki püüdurreseptorid, seovad ka klass A liikmed negatiivselt laetud ligande (Fogelman *et al.*, 1981). Lisaks sõltub seondumine SR-A retseptoritele ligandi struktuurist. On näidatud, et ligandi neljaharuline struktuur võib soodustada nende seondumist SR-A retseptoritega (Pearson *et al.*, 1993). Klass A püüdurreseptoritele sobivateks ligandideks on näiteks dsDNA (Dewitte-Orr *et al.*, 2010) ja dsRNA (Limmon *et al.*, 2008). Püüdurreseptoritel on oluline roll dsRNA äratundmisel, selle endotsüteerimisel ja kahjutustamisel (Limmon *et al.*, 2008). Seondudes dsDNAGA osalevad klass A püüdurreseptorid viiruste vastases kaitses (Dewitte-Orr *et al.*, 2010). Nende retseptorite seondumist DNAGA on ära kasutatud mitmete partiklite transportimisel rakku. Näiteks sisenevad DNA-kulla partiklid rakkudesse SR-A retseptorite vahendusel (Patel *et al.*, 2010). Samuti on kasutatud neid retseptoreid PF32-DNA komplekside transpordiks (Srimanee *et al.*, 2016).

SR-A3 retseptorit kodeeriv geen asub inimese kaheksandas kromosoomis ning selle ekspressiooni stimuleerib oksüdatiivne stress (Zani *et al.*, 2015). Selle retseptori teiseks nimetuseks on CSR ehk rakulise stressi vastus (inglise keeles *cellular stress response*) (Kelley *et al.*, 2014). Hani töögrupp eraldas 1998. aastal fibroblastidest SR-A3 geeni ning täheldas, et transkriptsioon sellelt geenilt tõusis UV-kiirguse ja vesinikperoksiidiga töötlemise tagajärjel. Näidati, et SR-A3 retseptorid eemaldasid keskkonnast ROSe (inglise keeles *reactive oxygen species*), kaitstes rakke sel viisil kahjustuste eest (Han *et al.*, 1998). CSR on ekspresseeritud ka eesnäärmevähis rakkudes, kus on näidatud selle rolli vähirakkude kasvu inhibeerimisel (Yu *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009).

SR-A5 retseptorit kodeeriv geen asub, nagu SR-A3 geengi, inimese kaheksandas kromosoomis. Sama geen on olemas ka teistel imetajatel, lindudel ja kaladel. SR-A5 retseptorit ekspresseeritakse mitmetes rakutüüpides, seda on leitud epiteeli, munandi, südame ja aju kudedest (Zani *et al.*, 2015). Struktuurilt sarnaneb teiste A klassi retseptoritega, kuid puudub tüüpiline α -heeliksi domään (Jiang *et al.*, 2006). Erinevalt teistest A klassi püüdurreseptoritest ei seonu SR-A5 atsetüleeritud või oksüdeeritud LDL partiklitega, vaid ferritiiniga ning transpordib selle endotsütoosi abil rakkudesse, millega kaasneb ka raua transport rakkudesse (Li *et al.*, 2009). Arvatakse, et kuna SR-A5 on ekspresseeritud eelkõige epiteelirakkudes, on sellel oluline roll kaasasündinud immuunsüsteemi toimimises (Jiang *et al.*, 2006).

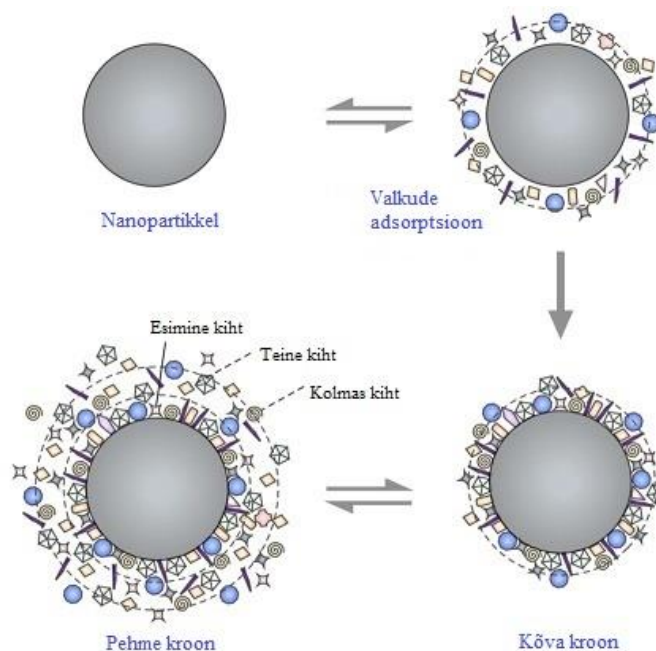
1.3 Valgu kroon ja selle moodustumise mehhanismid

Valgu kroon (ladina keeles *corona*) on bioloogilises keskkonnas nanopartiklite ümber moodustunud valkude kiht. Valgu krooni koostis ja teke sõltuvad nanopartiklite pinnalaengust, suurusest ja funktsionaalrühmadest partikli pinnal (Westmeier *et al.*, 2016). Valgu krooni termini võtsid esimesena kasutusele Cedervall ja teised, nimetades seda tähtsaks nanopartikli bioloogilise olemuse määramisel. See tekib valkude ja nanopartikli interaktsioonide tulemusena – erinevad valgud konkureerivad üksteisega partiklile seondumiseks ning see määrab partiklite edasise saatuse (Cedervall *et al.*, 2007). Valgu kroon määrab nanopartiklite interaktsiooni rakkudega, eluea veres, agregatsiooni, transpordi, kineetika ja toksilisuse (Rahman *et al.*, 2013).

Valgu krooni moodustumine on järk-järguline protsess – selle koostis muutub ajas valkude adsorptsiooni ja desorptsiooni tõttu (Rahman *et al.*, 2013; Docter *et al.*, 2015). Esmalt kogunevad partiklite ümber valgud, mida on keskkonnas rohkelt, kuid mille afiinsus nanopartiklite suhtes on madal. Hiljem vahetuvad need välja keskkonnas vähem esinevate, kuid partikli suhtes kõrgema afiinsusega molekulide vastu. Seda efekti nimetatakse Vromani efektiks, mida kirjeldas Vroman juba 1962. aastal (Vroman, 1962). Siiski ei ole võimalik valgu krooni moodustumise protsesse kirjeldada vaid Vromani efekti kaudu. Vromani efekt kirjeldab küll lihtsamat olukorda mõnede valkude segus, kuid ei kirjelda piisavalt olukorda keerulistes biosüsteemides (Docter *et al.*, 2015). Komplekssete biosüsteemide jaoks ei arvesta Vromani seadus piisavalt aeg-ruumi massi ümberjaotumiseks (Vogler, 2012). Sellest olenemata on näidatud Vromani efekti kehtivust nanopartiklite puhul ka komplekssetes biokeskkondades. Näidati valgurühmade seondumist ja eraldumist nanopartiklitelt aja jooksul, mis on seletatav energeetiliselt soodsamate sidemete loomisega. Valgu kroon moodustub partiklite ümber ligi 30 sekundi jooksul ning edaspidi muutub see pigem valkude arvu kui adsorbeerunud valkude poolest. (Tenzer *et al.*, 2013). Stabiilne kroon moodustub partikli ümber umbes tunni jooksul ning selle koostis ajas enam ei muutu (Monopoli *et al.*, 2011).

Valgu krooni kirjeldamiseks kasutatakse ka termineid pehme (*soft corona*) ja kõva (*hard corona*) kroon. Kõva krooni moodustavad valgud on otseses kontaktis nanopartiklitega ning on ka palju stabiilsem kui pehme kroon. Pehme krooni moodustavad partikli välimisel küljel olevad valgukihid, mis on seondunud nanopartiklitega kaudselt kõva krooni valkude kaudu nõrkade valk-valk sidemete abil. Kuna pehme kroon on ebastabiilne, siis on see ka tundlik pesudele ning on töötlusetappide käigus kergesti kaduv, mis seletab, miks selle mõjust on vähem teada (joonis 3).

Seetõttu peetakse valgu kroonist rääkides silmas eelkõige just kõva krooni (Westmeier *et al.*, 2016). Kuna pehme kroon moodustab kõige välimise kihi, siis arvatakse, et see osaleb esimese kontakti loomisel rakkudega (Wang *et al.*, 2016).



Joonis 3. Valgu krooni moodustumine nanopartikli ümber. Näidatud on valkude adsorptsiooni nanopartiklile, kõva ning pehme krooni teket (muudetud kujul Westmeier *et al.*, 2016).

Valgu krooni moodustumine on kompleksne protsess ning selle koostis on konkreetse partikli spetsiifiline (Walkey ja Chan, 2012), sõltudes nii partikli suuruselt, laengust kui ka seerumi koostisest (Rahman *et al.*, 2013). Üheks oluliseks krooni teket mõjutavaks faktoriks on nanopartikli pinnalaeng, kuna nii positiivselt kui ka negatiivselt laetud partiklid on suuremal hulgal opsoniseeritud kui laenguta partiklid (Aggarwal *et al.*, 2009). Lisaks mõjutavad laetud nanopartiklid valkude denaturatsiooni, neutraalsed partiklid mitte (Aubin-Tam ja Hamad-Schifferli, 2005). Sarnaselt laenguga osakeatele, adsorbeerivad ning denatureerivad hüdrofoobsed partiklid valke rohkem kui neutraalsed või hüdrofiilsed partiklid (Rahman *et al.*, 2013).

Lisaks laengule, on kindlaks tehtud, et valgu krooni teket ning koostist mõjutab oluliselt ka partiklite suurus (Lundqvist *et al.*, 2008) ning pinna kumerus. Tenzer ja teised näitasid, et juba kümne nanomeetri suurusel erinevused mõjutavad valgu krooni koostist. Näiteks klusteriin seondus pigem väiksemate partiklitega, gelsoliin ja protrombiin aga pigem suurematega, IgG ja aktiini seondumine ei sõltunud aga üldsegi partikli suuruselt (Tenzer *et al.*, 2011). Ka partikli pinna kumerus on oluline krooni moodustumisel. Kumera pinnaga partiklid takistavad valk-valk

interaktsioone ning seetõttu adsorbeerivad siledama pinnaga partiklid rohkem valke. Partikli pinna kumerus mõjutab ka adsorbeerunud valkude konformatsiooni – kumeramale pinnale adsorbeerunud valgud on vähem muutunud (Rahman *et al.*, 2013). Suurema kumerusega partikli pind takistab valkude seondumist. On võimalik, et sileda või vähese kumerusega pinnal moodustavad valgud kahemõõtmelise struktuuri, mis võimaldab partiklile mahutada rohkem valke. Suurema kumerusega partiklite puhul on aga valgud ruumiliselt nihkes ning seetõttu kirjeldatud struktuure ei moodusta (Lindman *et al.*, 2007).

Peale nanopartikli omaduste on valgu krooni tekkes ja koostises oluline ka keskkond. Nii kasutatud seerum kui ka selle kontsentratsioon mõjutavad krooni moodustumist. Näiteks *in vivo* katsetes erinevatel viisidel manustatud nanopartiklid erinevad koostise poolest ning mõjutavad sisenenud nanopartikleid (Docker *et al.*, 2015). Samuti on oluline seerumi kontsentratsioon, mis mõjutab tugevasti krooni kujunemist. *In vitro* kasutatud madalam seerumi kontsentratsioon võib põhjustada *in vivo* tulemuste valesti mõistmist, kuna *in vivo* kasutatud seerumi kontsentratsioon on kõrgem. Plasma kontsentratsiooni tõustes tõuseb nende valkude hulk, mida esialgu oli plasmas vähem ning mis seonduvad tugevasti partikli pinnale, tõrjudes välja nõrgemad seondujad (Monopoli *et al.*, 2011). Lisaks seerumile mõjutab krooni moodustumist ka kasutatav sööde, kuna söötmed erinevad üksteisest soolade ja suhkrute sisalduse poolest (Maiorano *et al.*, 2010).

1.3.1 Valgu krooni koostis

Walkey ja Chan on pannud kokku 125 valgust koosneva plasmavalkude rühma, mis on tuvastatud erinevatelt nanopartiklitelt erinevate eksperimentide käigus. Selle valkude kogumi nimetasid nad adsorbaadiks (inglise keeles *adsorbome*). Adsorbaadis leidub 2–6 rohkelt esinevat valku, millest kolm kõige levinumat moodustavad 56% kogu adsorbaadist. Kõige levinum valk moodustab aga 29% kogu adsorbaadist. Lisaks sellele on adsorbaadis veel palju teisi valke, mis on vähemal määral esindatud. Kuigi paljud valgud adsorbeeruvad suurel hulgal paljudele nanomaterjalidele, ei ole kõige enam esindatud valgud enamasti samad (Walkey ja Chan, 2012).

Valkude seondumise partiklile võib jagada kahte faasi: hiline ja varajane faas. Varjases faasis seonduvad albumiin, IgG ja fibrinogeen (Rahman *et al.*, 2013). Albumiin adsorbeerub kohe pea kõikidele partiklitele, kuid vahetub hiljem välja kõrgema afiinsusega valkude vastu (Lundqvist *et al.*, 2011). Hilises faasis seonduvad järk-järgult apolipoproteiinid ja koagulatsiooni valgud. Kõigepealt vahetub albumiin järk-järgult fibrinogeeni vastu vastu, mis seejärel asendatakse

apolipoproteiinidega. Kuigi apolipoproteiine on seerumis palju vähem kui fibrinogeeni, on nad tänu suuremale afiinsusele võimelised fibrinogeeni kroonist välja tõrjuma (Rahman *et al.*, 2013).

Nagu eelnevalt mainitud, mõjutab partikli laeng valgu krooni koostist (Rahman *et al.*, 2013). Gessner ja kolleegid uurisid adsorbeerunud valke erinevate funktsionaalsete rühmadega latekspartiklidel. Näidati, et aluselistele partiklitele adsorbeerusid suuremal hulgal valgud, mille pI oli väiksem kui 5,5. Aluseliste funktsionaalrühmadega partiklitele seondusid eelistatult albumiin ja IgG. Happeliste funktsionaalrühmadega partiklitele adsorbeerusid pigem valgud, mille pI oli suurem kui 5,5, näiteks ApoH ja hemoglobiin (Gessner *et al.*, 2003). Lisaks on näidatud, et negatiivse laenguga silikoonist nanopartikliga seondusid eelkõige negatiivse laenguga valgud, olenemata nende valkude hulgast seerumis (Tenzer *et al.*, 2011).

Valgu krooni koostises on valdavaks immunoglobuliinid, komplemendi valgud ja apolipoproteiinid. Kui immunoglobuliinid ja komplemendi valgud krooni koostises vähendavad partikli eluiga veres, siis apolipoproteiinid aga pikendavad seda efekti. Mitmed apolipoproteiinid on võimelised raku sisenema ka püüdurretseptorite vahendusel. Apolipoproteiinid, mille SR-B püüdurretseptorid ära tunnevad on ApoA1, ApoA2, ApoA4, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoD ja ApoE (Pozzi *et al.*, 2014). Lisaks on tehtud katsed, kus tehti kindlaks valgu krooni täpne koostis ning uuriti partiklite sisenemist rakkudesse. Saadud tulemuste vahel leiti korrelatsioonikonstandid, et leida, millised valgud soodustavad ning millised takistavad partiklite sisenemist rakkudesse. Leiti, et partiklite sisenemist rakkudesse indutseeris apolipoproteiin ApoH, samas kui ApoC4 ja ApoC3 inhibeerisid (Ritz *et al.*, 2015).

Krooni moodustavatest valkudest on oluline ka seerum albumiin, mida leidub valgu kroonis suurel hulgal. Seondudes nanopartikliga võib muutuda albumiini konformatsioon ning selle tunnevad ära SR-A retseptorid. On näidatud, et muutunud konformatsiooniga albumiin nanopartiklite pinnal soodustab partiklite sisenemist rakkudesse püüdurretseptorite vahendusel (Yan *et al.*, 2013; Mortimer *et al.*, 2014). Krooni valkudest indutseerib partiklite sisenemist ka vitronektiin. Näidati, et vitronektiin indutseeris partiklite sisenemist vähirakkudesse, tundes ära nende pinnal eksponeeritud spetsiifilise retseptori (Caracciolo *et al.*, 2013).

Mitmed uuringud on näidanud, et valgu kroon mõjutab partiklite sisenemist rakkudesse (Treuel *et al.*, 2015). Samuti on näidatud, et seerumita keskkonnas sisenevad nanopartiklid rakkudesse efektiivsemalt kui seerumiga keskkonnas (Lesniak *et al.*, 2012). Soodustamaks partiklite

sisenemist, on partikleid proovitud katta molekulidega, millel on rakku sisenemiseks kindel retseptor, näiteks transferiin. Sellisel juhul valgu krooni juuresolekul nanopartiklite sisenemine rakkudesse vähenes ning kaotas oma spetsiifilisuse (Salvati *et al.*, 2013). Kõige efektiivsemalt tungisid rakkudesse katmata nanopartiklid (Jiang *et al.*, 2010), mis tähendab, et valgu kroon võib blokeerida partiklite pinnal olevad valgud (Salvati *et al.*, 2013).

Nanopartiklite rakendamisel meditsiinis on oluline uurida ka nende võimalikku toksilist mõju organismile. Valgu kroon on oluline partiklite akumulatsioonil, biolagunemisel, organismist väljutamisel ja ka immuunvastuse regulatsioonis (Tenzer *et al.*, 2013). Samas arvatakse, et partiklile seondudes võib muutuda valkude konformatsioon, mis võib viia funktsiooni muutuse ja krüptiliste epitoopide tekkeni (Treuel *et al.*, 2015). Kui valk seondub partiklile ning paljastuvad krüptilised epitoobid, võib see vallandada immuunvastuse (Nel *et al.*, 2009).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Selle bakalaureusetöö eesmärkideks on:

- uurida kas ja milline on hiire, inimese ja veise vereseerumiga söötmes PF14-SCO nanokomplekside ümber moodustunud biokrooni efekt SR-A3 ja SR-A5 pinnale toomisel;
- uurida hiire, inimese ja veise vereseerumist tekkinud PF14-pDNA komplekside biokrooni koostist.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Rakkude kultiveerimine

Käesolevas töös kasutati inimese emakakaela kartsinoomi rakke HeLa pLuc-705, mida kasvatati IMDM (Corning, 10016158R) söötmes, millele oli lisatud 10% FBSi (fetal bovine serum) ning 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. Rakke kasvatati 37°C ja 5% CO₂ juures.

2.2.2 Kasutatud oligonukleotiidid ja RSPd

Mass-spektromeetria ja SDS geelelektroforeesi katsete jaoks kasutati pGL3 lutsiferaasi kodeerivat plasmidi (4,7 kDa). Immunofluorestsentsi katsete jaoks kasutati splaissingut korrigeerivat fosforotioaat 2'-O-metüül oligonukleotiidi (5'-CCU CUU ACC UCA GUU ACA-3'), mille 5' terminussele oli lisatud fluorestseeruv Cy5 märgis (Microsynth, Switzerland). Transportpeptiidina kasutati PepFect14 peptiidi (stearüül- AGYLLGKLLOOLAAAALLOLL-NH₂), mis oli sünteesitud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

2.2.3 Nanokomplekside formeerimine

SDS geelelektroforeesi ja mass-spektromeetria jaoks formeeriti nanokompleksid PF14, biotinüleeritud pDNA ja streptavidiiniga kaetud magnetpartiklite (Thermo Scientific, PG1879872) vahel.

pDNA märkimiseks biotiiniga kasutati Nucleic Acid Labeling Kit vastavalt tootja protokollile (Mirus Label It® Biotin Kit, 51034662). Lühidalt, biotiini reagent segati kokku pDNAga (1 µg/µl)

suhtega 1:2 (v:w) märgistamise puhvris (*Labeling Buffer A*) ning inkubeeriti 1 tund 37°C juures raputajal (300 rpm). Vaba biotiin eemaldati märgistatud pDNAs etanooliga pretsipitatsiooni teel ning puhastatud biotinüleeritud pDNA (b-pDNA) lahustati MilliQ vees.

SDS-PAGE jaoks kasutati 1 µg b-pDNAd ühe proovi kohta ning segati kokku SA-magnetpartiklitega suhtega 1:2 ning mass-spektromeetria jaoks 2 µg b-pDNAd ja SA-magnetpartikleid suhtega 1:2. b-pDNA ja SA-magnetpartikleid inkubeeriti 15 minutit 37°C juures raputajal (300 rpm). Seejärel lisati PF14 laengusuhtega 1:3 ning inkubeeriti veel 30 minutit toatemperatuuril.

Immunofluorestsents katse jaoks moodustati mittekovalentsed kompleksid 1 µM PF14 ja 200 nM SCO vahel MilliQ vees 1/10 lahuse lõppruumalas. Enne rakkudele kandmist lasti kompleksidel formeeruda 30 minutit toatemperatuuril ning seejärel viidi lahuse ruumala lõppmahuni vastavate söötmelega.

2.2.4 SDS-PAGE

PF14-pDNA nanokomplekside ümber moodustuva valgu krooni koostise analüüsimiseks inkubeeriti komplekse esmalt 0%, 10%, 50% ja 100% hiire, veise ning inimese seerumit sisaldavas söötmes 30 minutit 300 rpm juures toatemperatuuril. Söötmetesse oli lisatud ka 1:100 lahjendusega proteaasi inhibiitorite segu. Pärast inkubatsiooni pesti proove 3 korda 5 minutit PBSiga, kogudes magnetpartiklid magneti abil tuubiserva.

Valkude lahutamiseks geelelektroforeesiga valmistati 10% separatsiooni ning selle peale 4% kontsentreeriv SDS-polüakrüülamiidgeel. Igale proovile lisati 20 µl 1x SDS proovi puhvrit, mis sisaldas 2% beetamerkaptoetanooli, et eraldada valgud magnetpartiklite küljest ning proove kuumutati 5 minutit 100°C juures. Magnetpartiklid eraldati proovidest magnetjala abil ning 15 µl proovi kanti geelile. Valgubändide hindamiseks molekulmassi järgi kanti geelile ka PageRuler Prestained Ladder suurusmarker (Thermo Fisher; 00289411). Geelelektroforeesi läbiviimiseks kasutati BioRad PowerPac Basic masinat (BioRad, USA). Geelil lasti joosta 15 minutit 60 V juures ning seejärel 30 minutit 180 V juures, puhvrina kasutati 1x SDS jooksupuhvrit. Valgubändid visualiseeriti hõbedaga värvimise meetodil, milleks kasutati Biorad Silver Stain Kit'i (kataloogi number 161-044), vastavalt tootja protokollile. Geel on skaneeritud CanoScan 5600F'iga.

2.2.5 Mass-spektromeetria

PF14-pDNA ümber moodustunud valgu krooni analüüsiti mass-spektromeetria abil. Valmistati IMDM söötmed, mis sisaldasid 10% veise, inimese ja hiire seerumit ning proteaasi inhibiitorite segu lahjendusega 1:100. Eelnevalt formeeritud nanokomplekside ruumala viidi erinevate söötmetega 1 milliliitrini ning proove inkubeeriti toatemperatuuril raputajal 300 rpm juures. Seejärel proovid pesti 5 korda 5 minutit TBS puhvriga magnetjalal ning analüüsiti mass-spektromeetriaga. Mass-spektromeetria analüüsi viis läbi vastav spetsialist Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi proteoomika tuumiklaborist.

2.2.6 Mass-spektromeetria ja SDS tulemuste analüüs

Mass-spektromeetria tulemuste analüüsiks arvutati kokku kogu valkude hulk kõikides seerumites. Seejärel jaotati valgud seitsmesse gruppi: lipoproteiinid, koagulatsiooni valgud, komplemendi valgud, immuunoglobuliinid, koelekked valgud, akuutse faasi valgud ning muud valgud. Leiti valkude hulk vastavas grupis ning arvutati, kui suure osa moodustab see kogu valkude hulgast. Lisaks leiti vastavalt molekulmassidele valgud, mis vastaksid SDS geelelektroforeesil tekkinud bändidele. Valgud sorteeriti ka molekulmassi järgi rühmadeks ning arvutati, kui suure osa moodustab see rühm kõikidest valkudest (%). Venni diagrammi loomiseks kasutati programmi: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

2.2.7 Konfokaalmikroskoopia

Kaks päeva enne eksperimendi algust külvati HeLa pLuc-705 rakud ümmargustele klaasidele 24-kannulisele plaadile tihedusega 30 000 rakku ühe kannu kohta. Ülejärgmisel päeval pesti rakke kaks korda seerumivaba IMDM söötmega ning lisati sööde, mis sisaldas 10% inimese, hiire või veise seerumit või seerumivaba IMDM söödet ja inkubeeriti 15 minutit 37°C juures. Seejärel lisati eelnevalt formeeritud kompleksid ning inkubeeriti veel 30 minutit 37°C juures. Pärast inkubatsiooni pesti rakke 2 korda PBSiga ning fikseeriti 3% PFA lahusega fosfaatpuhvril 15 minutit toatemperatuuril. Pärast fikseerimist pesti rakke korra PBSiga, permeabiliseeritud kontrolli töödeldi 0,1% Triton X-100ga 5 minutit jääl. Raku plasmamembraani terviklikkuse kontrollimiseks inkubeeriti rakke 5 minuti jooksul DNAGA seonduva fluorestseeruva värviga DAPI (lahjendus 1:2000). Pärast DAPI töötlust rakud pesti. Mittespetsiifiliste seondumiste blokeerimiseks inkubeeriti rakke 30 minutit 10% rasvavabas piimapulbri lahuses PBSis (NFDM, *non-fat dry milk*, Applichem, 5U010811). Primaarsete antikehadega inkubatsiooniks valmistati 1%

NFDM lahus PBSis, kuhu lisati SR-A3 ja SR-A5 antikehad (tabel 2) ning rakke inkubeeriti tund aega toatemperatuuril, misjärel rakud pesti ning inkubeeriti vastavate sekundaarsete antikehadega (tabel 2) 1% NFDM lahuses PBSis 30 minutit toatemperatuuril pimedas. Pärast inkubatsiooni pesti klaase kolm korda 5 minutit PBSiga ning klaasid sulundati PBSis lahustatud 30% glütserooli tilga sees. Preparaadid analüüsiti konfokaalmikroskoobiga Olympus FV1000 (Olympus, Jaapan). Piltide töötlemiseks kasutati programmi Olympus Fluoview (versioon 4.2a).

2.2.8 Konfokaalmikroskoopia kvantifikatsioon

Konfokaalmikroskoopia tulemuste kvantifitseerimiseks kasutati programmi Olympus Fluoview (version 4.2a). Loeti umbes 100 rakku proovi kohta ning mõõdeti keskmised fluorestsentsi intensiivsused raku kohta. Tulemustest võeti keskmised kolme katse kohta ning need on väljendatud suhtelise fluorestsentsi ühikuna. Kõikide proovide intensiivsustest on lahutatud taust ehk kontrollrakkude fluorestsentsi intensiivsus. Saadud tulemused on kujutatud graafikul (joonised 4 ja 5).

Tulemuste statistilise olulisuse määramiseks arvutati p-väärtused iga seerumi kohta, võrreldes kompleksidega proove ilma kompleksideta proovidega. P-väärtuste arvutamisel kasutati kahepoolset ning paaris tulemustega T-testi valemit.

2.2.9 Kasutatud antikehad

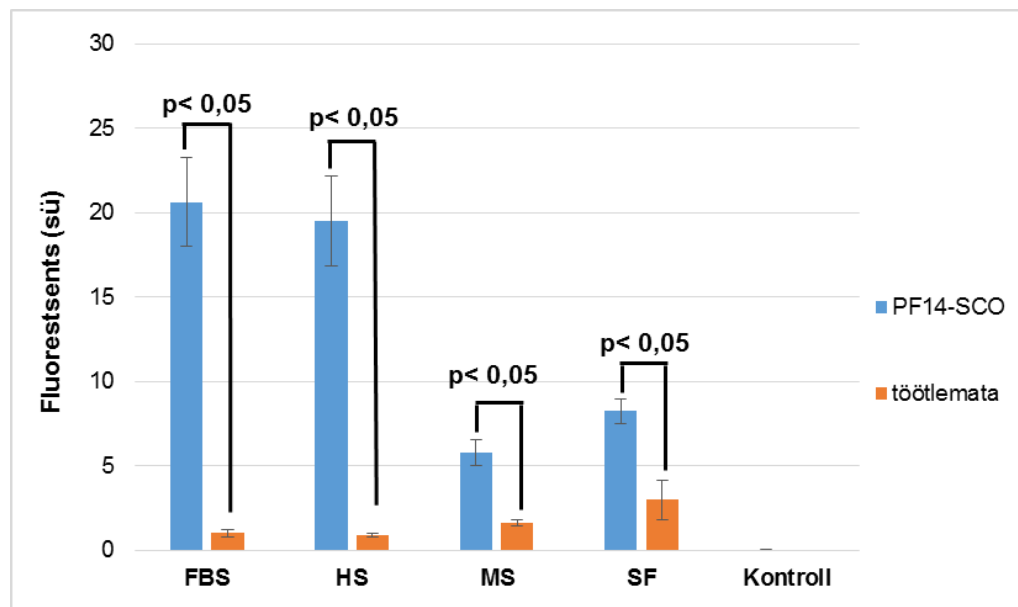
Tabel 2. Töös kasutatud antikehad

Antikeha nimetus	Peremees, LOT number	Tootja	Lahjendus
SR-A3	Kits, C2513	Santa Cruz Biotechnology	1:50
SR-A5	Küülik, R12563	Sigma	1:50
Alexa 555 konjugeeritud küüliku vastane antikeha	Kits, 1454436	Invitrogen	1:300
Alexa 555 konjugeeritud kitse vastane antikeha	Küülik, 1562309	Invitrogen	1:300

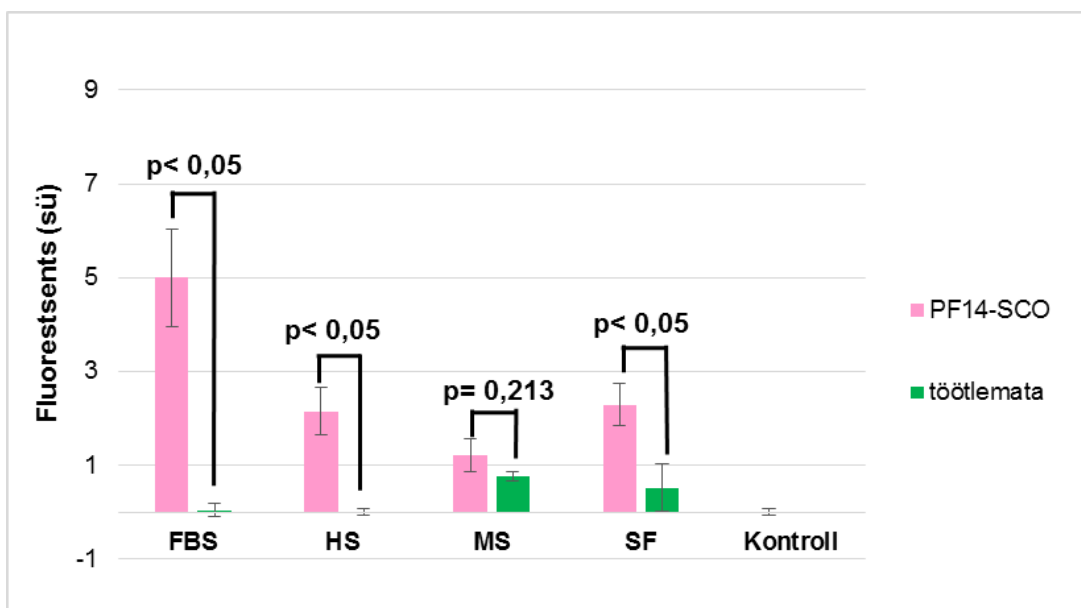
2.3 Tulemused

2.3.1 Inimese, veise ja hiire vereseerumi valkude mõju püüdurreseptorite SR-A3 ja SR-A5 pinnale toomisel PF14-SCO kompleksidega

Mõned aastad tagasi avastati, et PF14-SCO kompleksid sisenevad rakkudesse SR-A3 ja SR-A5 retseptoreid kasutades (Ezzat *et al.*, 2012). Hiljuti näidati aga, et SR-A3 ja SR-A5 retseptorid ei ole pidevalt eksponeeritud HeLa rakkude pinnal, vaid need indutseeritakse rakkude pinnale alles nende töötlemisel nanokompleksidega (Juks *et al.*, 2015). Käesoleva bakalaureuse töö esimeseks eesmärgiks oli uurida, kas ja millist mõju avaldab erinevates seerumites nanokomplekside ümber tekkinud valgu kroon püüdurreseptorite pinnaletoomisel. Selleks inkubeeriti PF14-SCO komplekse 10% inimese, veise ja hiire seerumit sisaldavas söötmes või seerumivabas söötmes ning tulemusi võrreldi töötlemata rakkudega. Rakud fikseeriti mitte-permeabiliseerivalt, et tuvastada retseptorid, mis tuuakse rakkude pinnale.



Joonis 4. SR-A3 retseptorite pinnale indutseerimine PF14-SCO kompleksidega ning ilma kompleksideta inimese (HS), veise (FBS) ja hiire seerumit (MS) sisaldavas ning seerumivabas söötmes. Veapiirid on esitatud standardveana kolme katse kohta ning igast proovist on lahutatud taust ehk kontrollrakkude fluorestsentsi intensiivsus. Y-teljel on toodud fluorestsentsi väärtused suhtelise ühikuna (sü). Tulpade kohal on toodud p-väärtused, mis on statistiliselt olulised kui $p < 0,05$. Viimaseks tulpaks on kontrollrakkud, mida ei töödeldud antikehade ega kompleksidega.



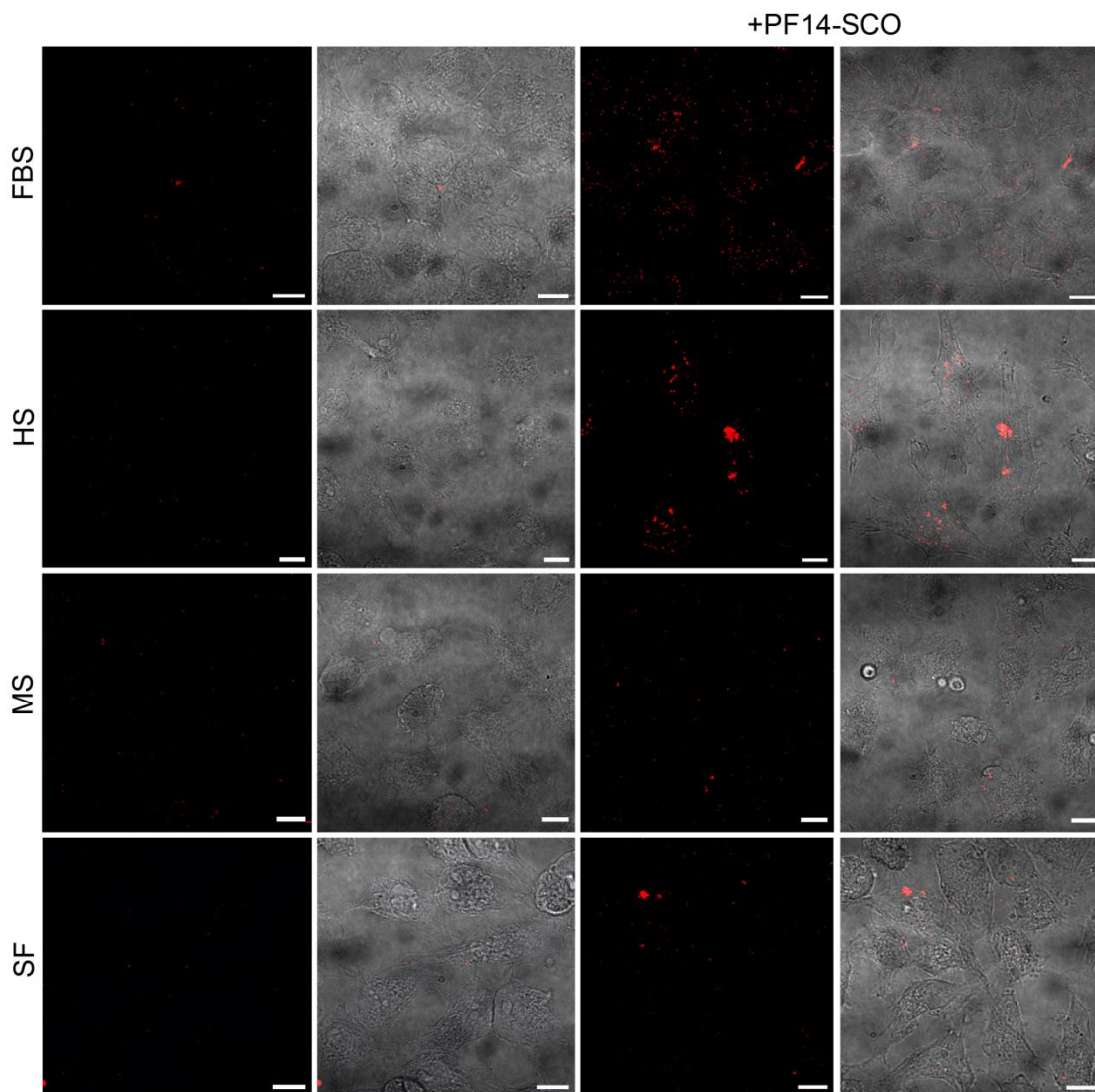
Joonis 5. SR-A5 retseptorite pinnale indutseerimine PF14-SCO kompleksidega ning ilma kompleksideta inimese (HS), veise (FBS) ja hiire seerumit (MS) sisaldavas ning seerumivabas söötmes. Veapiirid on esitatud standardveana kolme katse kohta ning igast proovist on lahutatud taust ehk kontrollrakkude fluorestsentsi intensiivsus. Y-teljel on toodud fluorestsentsi väärtused suhtelise ühikuna (sü). Tulpade kohal on toodud p-väärtused, mis on statistiliselt olulised kui $p < 0,05$. Viimaseks tulbaks on kontrollrakkud, mida ei töödeldud antikehade ega kompleksidega.

Katsete tulemused (joonised 4–7) kinnitasid varasemaid tulemusi – SR-A3 ja SR-A5 retseptoreid ei esine töötlemata rakkude pinnal. Nende translokatsioon rakkude pinnale indutseeritakse komplekside lisamisega (Juks *et al.*, 2015). Kompleksidega töötlemata rakkude fluorestsentsi intensiivsuste tase jäi kontrollrakkudega ligikaudu samale nivoole veise ja inimese seerumi proovide puhul. Seerumivabas ja hiire seerumiga söötmes on kompleksidega töötlemata rakkude intensiivsuste tase mõnevõrra kõrgem, selle põhjuseks võib olla ebasoodne keskkond, mis võib soodustada SR-A retseptorite translokatsiooni.

Joonistelt 4 ja 6 selgub, et kõige enam indutseerisid SR-A3 retseptorite translokatsiooni raku pinnale veise seerumiga söötmes inkubeeritud PF14-SCO nanokompleksid. Ligikaudu samas ulatuses oli ka inimese seerumiga söötmes moodustunud valgu krooni mõju retseptorite pinnale toomisele. Märgatavalt vähem indutseerisid SR-A3 retseptoreid raku pinnale nanopartiklid seerumivabas ja hiire seerumiga söötmes. Nende proovide p-väärtused olid siiski palju väiksemad 0,05st, mis tähendab, et tulemused on kõikidel juhtudel statistiliselt olulised.

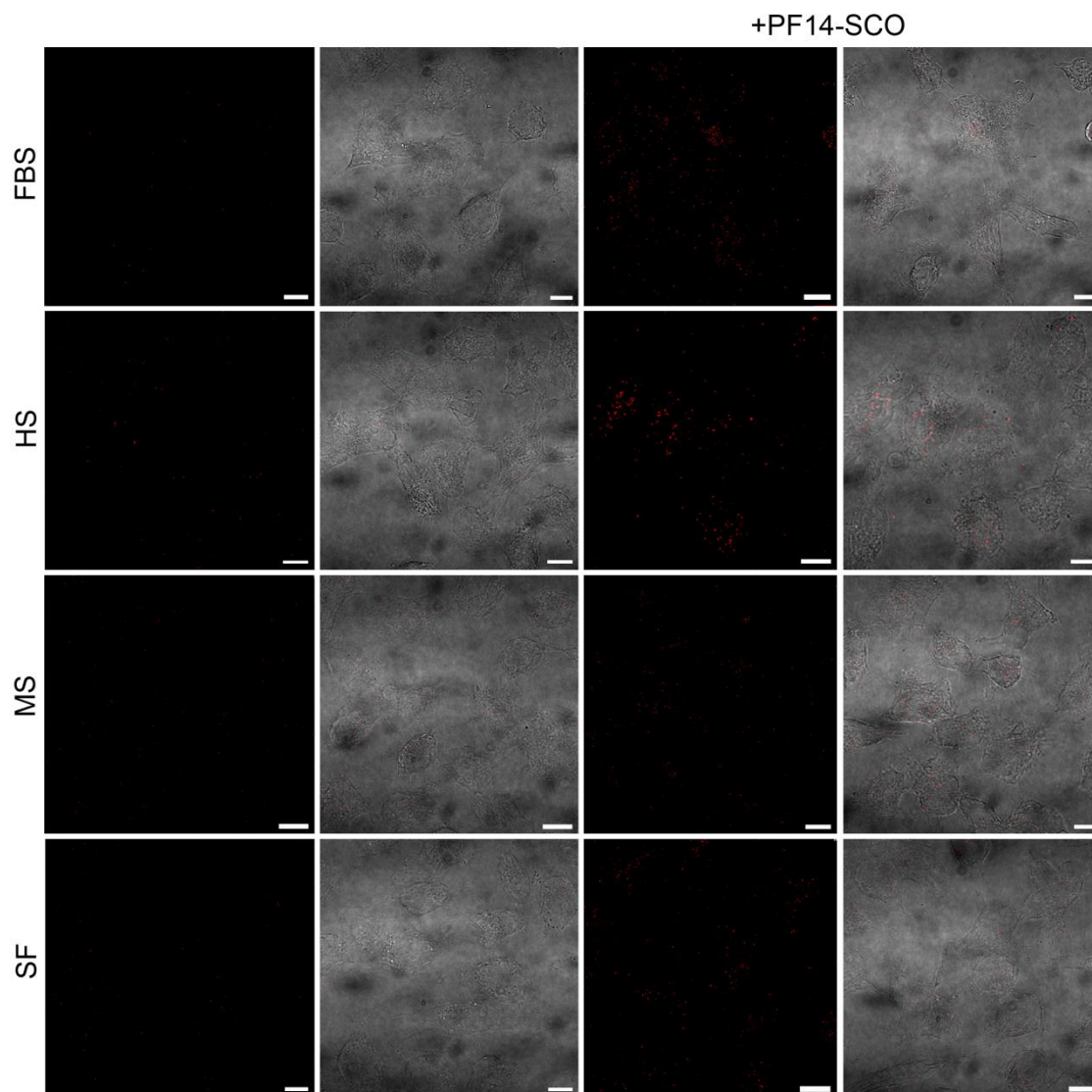
SR-A5 retseptorite hulk rakkude pinnal (joonis 5 ja 7) on SR-A3ga võrdlemisi sarnane – mõlemal juhul soodustas retseptorite pinnaletulekut kõige enam veise seerumiga söötmes moodustunud

valgu kroon. Samas on SR-A5 retseptorite arvukus rakkudel tunduvalt madalam kui SR-A3 retseptorite puhul ning seda kõikides söötmetes. Lisaks on erinev mõju ka hiire seerumiga söötmes moodustunud valgu kroonil. SR-A5 hulk rakkudel inimese seerumiga söötmes ning seerumvabas söötmes ligikaudu samal tasemel, SR-A3 retseptorit oli inimese seerumiga söötmes aga rohkem ekspresseeritud.

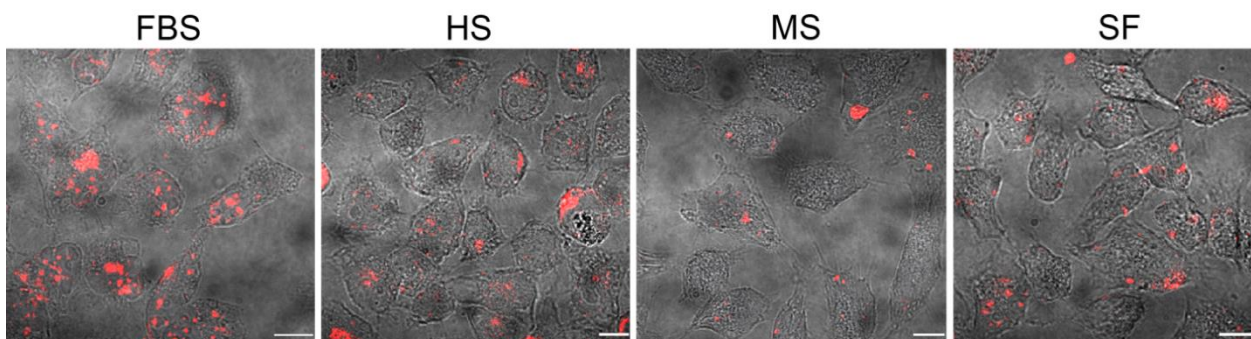


Joonis 6. SR-A3 retseptorite paiknemine raku pinnal töötlemata ja PF14-SCO kompleksidega töödeldud rakkudes. Rakke inkubeeriti 15 minutit vastavates seerumites ning seejärel 30 minutit eelnevalt formeeritud PF14-SCO kompleksidega. Pärast inkubatsiooni rakud fikseeriti mittepermeabiliseerivalt 3% PFAGA ning pinnal eksponeeritud SR-A3 retseptorid tuvastati vastava primaarse antikehaga ning AF555 märgistatud sekundaarse antikehaga. Punasega on märgitud SR-A3 retseptorid ning sinisega on tähistatud DAPIga värvunud rakud. Parempoolsetes tulpades on toodud töötlemata rakkude ning vasakpoolsetes koos kompleksidega inkubeeritud rakkude konfokaalmikroskoopia kujutised. FBS – veise seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid, HS – inimese seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid, MS – hiire seerumiga söötmes

inkubeeritud nanopartiklid ja SF – seerumivabas söötmes inkubeeritud nanopartiklid. Mõõtlõigu pikkuseks on 10 µm.



Joonis 7. SR-A5 retseptorite paiknemine raku pinnal töötlemata ja PF14-SCO kompleksidega töödeldud rakkudes. Rakke inkubeeriti 15 minutit vastavates seerumites ning seejärel 30 minutit eelnevalt formeeritud PF14-SCO kompleksidega. Pärast inkubatsiooni rakud fikseeriti mittepermeabiliseerivalt 3% PFAGA ning pinnal eksponeeritud SR-A3 retseptorid tuvastati vastava primaarse antikehaga ning AF555 märgistatud sekundaarse antikehaga. Punasega on märgitud SR-A5 retseptorid ning sinisega on tähistatud DAPIga värvunud rakud. Parempoolsetes tulpades on toodud töötlemata rakkude ning vasakpoolsetes koos kompleksidega inkubeeritud rakkude konfokaalmikroskoopia kujutised. FBS – veise seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid, HS – inimese seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid, MS – hiire seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid ja SF – seerumivabas söötmes inkubeeritud nanopartiklid. Mõõtlõigu pikkuseks on 10 µm.



Joonis 8. HeLa rakkudega seondunud PF14-SCO kompleksid. Rakke inkubeeriti 15 minutit vastavates seerumites ning seejärel 30 minutit eelnevalt formeeritud PF14-SCO kompleksidega. Pärast inkubatsiooni rakud fikseeriti mittepermeabiliseerivalt 3% PFAGA. Joonisel on punasega tähistatud Cy5, millega oli SCO märgistatud. FBS – veise seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid, HS – inimese seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid, MS – hiire seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklid ja SF – seerumivabas söötmes inkubeeritud nanopartiklid. Mõõtlõigu pikkuseks on 10 μ m.

Lisaks korreleerub raku pinnal olevate retseptorite hulk ka seondunud partiklite hulga (joonis 8). Selgus, et kõige rohkem on rakkudega seondunud veise seerumiga söötmes inkubeeritud partiklid ning kõige vähem hiire seerumiga söötmes inkubeeritud partiklid. Partiklite seondumine rakkudega inimese seerumiga söötmes oli aga oodatust madalam.

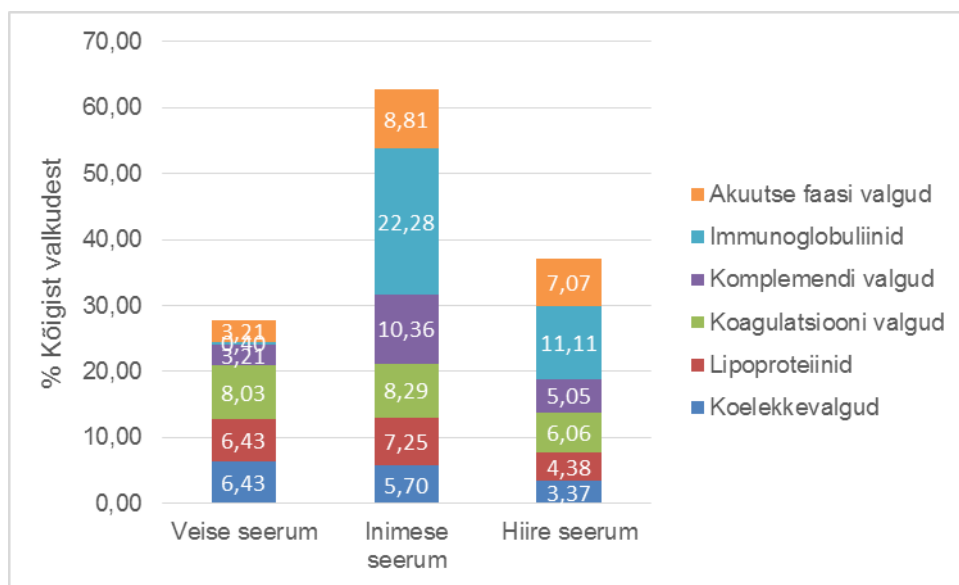
Need tulemused näitavad selgelt, et eri seerumites moodustunud valgu kroon mõjutab oluliselt nii partiklite seondumist rakkudega kui ka SR-A3 ja SR-A5 retseptorite hulka raku pinnal.

2.3.2 Inimese, veise ja hiire vereseerumiga söötmes tekkinud valgu kroonis esinevad olulisemad valgurühmad ja nende osakaal.

Lisaks valgu krooni mõjule SR-A retseptorite translokatsioonile rakkude pinnale ning komplekside interaktsioonile raku plasmamembraaniga, tahtsime teada ka PF14-oligonukleotiidi nanokomplekside ümber jääva valgu krooni koostist. Selleks inkubeeriti komplekse 10% inimese, veise ja hiire seerumit sisaldavas söötmes 30 minutit. Selline kontsentratsioon valiti, kuna sellist seerumi kontsentratsiooni kasutatakse tavapäraselt rakkude kasvatamisel ja rakukatsetes. Valgu krooni koostist analüüsiti esmalt mass-spektromeetriliselt.

Nanopartiklite ümber moodustuva biokrooni valkude füsioloogiline funktsioon võib varieeruda, kuid enamik neist valkudest osalevad näiteks lipiidide transpordis ning nende hulgas on ka palju hüübimisfaktoreid, komplemendi aktivatsiooni valke ning ka immunoglobuliine (Pozzi *et al.*, 2015a). Ka PF14-pDNA nanopartiklite biokrooni valkude hulgas leidub nii koagulatsioonivalke,

lipoproteiine, koelekke valke, immunoglobuliine, akuutse faasi valke, komplemendi faktoreid ja ka muid valke (Pozzi *et al.*, 2015a; Ritz *et al.*, 2015; Tenzer *et al.*, 2013). Joonisel 9 on toodud vastavate valkude osakaal kogu valgu kroonist protsendina.

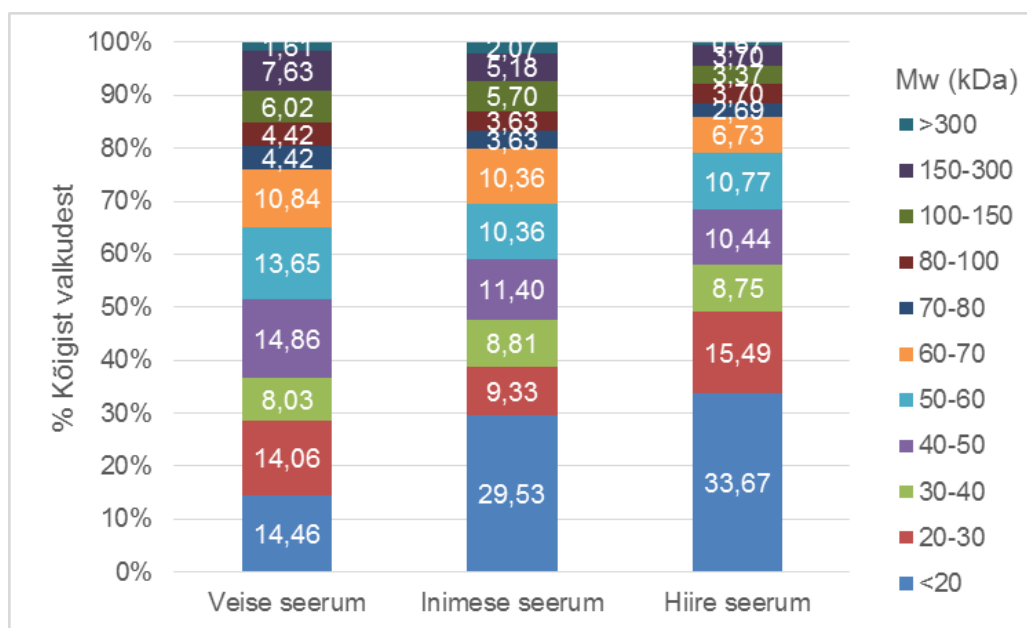


Joonis 9. Inimese, hiire ja veise seerumi valgu krooni analüüs. Näidatud on, kui suure osa moodustab mingi valkude rühm kõikidest PF14-pDNA nanopartiklitele adsorbeerunud valkudest. Valgud on grupeeritud vastavalt Pozzi jt artiklis toodud rühmadele (Pozzi *et al.*, 2015a)

Proteoomika analüüsi käigus selgus, et kõige rohkem seondus valke nanopartiklitele hiire seerumiga söötmes, kus tuvastati kokku 297 valku. Inimese seerumiga söötmes seondus nanopartiklitega 197 valku ning veise seerumiga söötimest tuvastati 249 erinevat valku. Hiire ja veise seerumiga söötmes leidis palju ka tundmatuid valke, mida proteoomika abil polnud võimalik tuvastada. Jooniselt 9 on ka näha, et inimese seerumiga söötmes joonistub valkude jaotumise muster selgemini välja kui hiire või veise seerumiga söötmes.

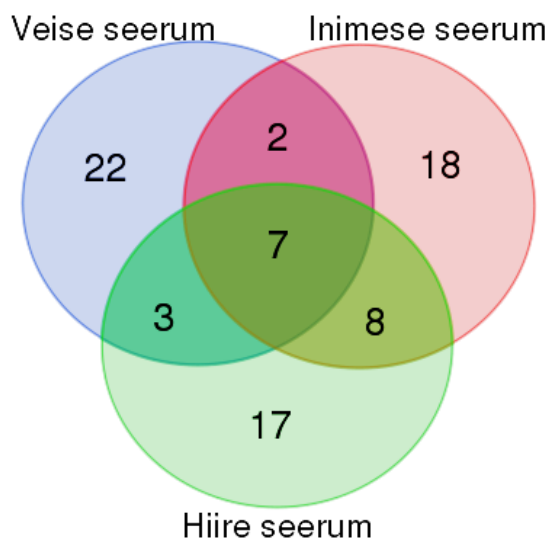
Valgu krooni moodustavad suures osas immunoglobuliinid, komplemendi valgud ja apolipoproteiinid (Pozzi *et al.*, 2015a). Kõige suurema osa valkudest inimese ja hiire seerumiga söötmes tekkinud valgu kroonist moodustavad immunoglobuliinid (joonis 9). Suuresti on esindatud ka komplemendi valgud, akuutse faasi valgud ja apolipoproteiinid. Veise seerumi puhul moodustavad need valgurühmad ainult väikese osa kõikidest valkudest. Kõige enam esinenud valkude rühm veise seerumiga söötmes on koagulatsiooni valgud. Samas oli veise seerumi kroonis võrreldes teiste seerumitega kõige rohkem tundmatuid valke, mis selgitab ka valkude jaotuste erinevusi teiste seerumitega.

Lisaks valkude funktsioonile võib valgud jaotada ka nende molekulmassi järgi. Joonisel 10 on toodud valgu krooni valkude jaotus molekulmassi alusel. Selle järgi selgub, et nanopartiklitega võivad interakteeruda väga erineva molekulmassiga valgud. Tulemuste alusel võib öelda, et eelistatult seonduvad partiklitega siiski väiksema molekulmassiga valgud, mille suurus on kuni 70 kDa. Hiire ja inimese seerumi valkudest moodustasid alla 20 kDa suurused valgud ligi 30%. Valgud suurusega 20–70 kDa olid seerumites jaotunud enam-vähem võrdselt – iga 10 kDa ulatus moodustas umbes 10% kogu valkudest. Suuremad kui 70 kDa valgud olid oluliselt vähem esindatud. Kõige vähem leidus seerumites üle 300 kDa suuruse molekulmassiga valke. Hiire seerumi valkudest moodustasid üle 300 kDa suurused valgud aga alla 1% kõigist valkudest. Ka teistes seerumites olid üle 300 kDa suurused valgud kõige vähem esindatud (kuni 2% kogu valkudest).



Joonis 10. Valgu krooni valkude jaotus molekulmassi järgi (kDa).

2.3.3 Unikaalsed ja ühised valgud kolme erineva seerumiga söötmes tekkinud valgu kroonis.

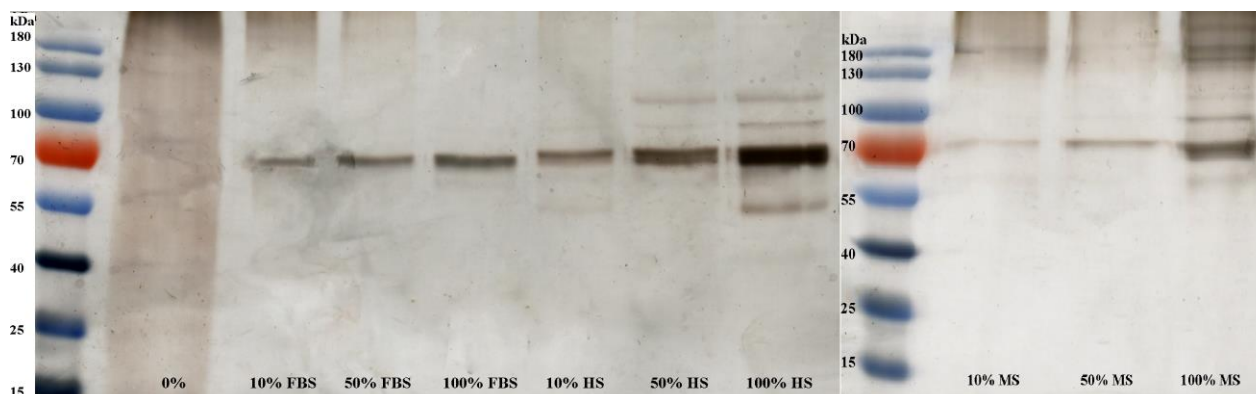


Joonis 11. Venni diagramm 35 enim esindatud valgust inimese veise ja hiire seerumiga söötmes (mass-spektromeetria katse andmetel). Joonisel on näidatud, kui palju on eri seerumites ühiseid ning unikaalseid valke. Valkude eesti- ja ingliskeelsed nimetused ning nende molekulmassid on toodud Lisa 1, tabel 4. Sinisega on tähistatud veise seerumiga söötimest, rohelisega hiire ning punasega inimese seerumiga söötimest leitud valgud.

Võrreldes erinevate seerumite kõige enam levinud valke selgus, et mitmed nendest valkudest on olemas kõikides seerumites (joonis 11). Selliseid valke oli kokku seitse ning need on komplemendi valk C3, vitamiin D-siduv valk, hemopeksiin, serotransferriin, seerum albumiin, alfa-2-makroglobuliin ja alfa-2-HS-glükoproteiin (Lisa 1 tabel 4). Nendest valkudest oli kõikides seerumites kõige kõrgema intensiivsusega esindatud seerum albumiin.

Lisaks oli sarnaseid valke ka kahe seerumi võrdluses (joonis 11). Inimese ja hiire seerumiga söötmes on kõige rohkem ühiseid valke, kokku kaheksa valku. Veise ja hiire seerumiga söötmes on ühiseid valke kolm ning veise ja inimese seerumiga söötmes kaks. Ka unikaalsete valkude arv on seerumites erinev. Kõige rohkem unikaalseid valke leidis veise seerumiga söötmes, kõige vähem aga hiire seerumiga söötmes.

2.3.4 SDS-geelelektroforeesi analüüs inimese, veise ja hiire vereseerumis inkubeeritud PF14-pDNA komplekside valgu kroonist



Joonis 12. SDS-geelelektroforees PF14-pDNA komplekside biokrooni valkude tuvastamiseks. Nanopartiklite ümber moodustunud biokrooni valgud denatureeriti laadimispuhvrts ja seejärel analüüsiti neid 10% SDSi sisaldavas polüakrüülamiid geelis. Vasakult esimene bänd on suurusmarker koos vastavate tähistustega. Sellele järgneb seerumivabas IMDM söötmes inkubeeritud PF14-pDNA partiklid. Seejärel 10%, 50% ja 100% veise (FBS) ning 10%, 50% ja 100% inimese (HS) seerumis inkubeeritud PF14-pDNA kompleksid. Järgmisel real on taas suurusmarker ning seejärel 10%, 50% ja 100% hiire seerumis (MS) inkubeeritud PF14-pDNA kompleksid.

Kõige rohkem bände (joonis 12) oli võimalik tuvastada hiire seerumist, mis vastab ka mass-spektromeetria tulemustele, mille järgi interakteerus nanopartiklitega kõige enam valke hiire seerumis. Lisaks tuvastati mitmeid bände ka inimese seerumis. Kuigi mass-spektromeetria andmete järgi esines veise seerumis rohkem erinevaid valke kui inimese seerumis, tuleb veise seerumi kroonist esile vähem bände kui inimese või hiire seerumi kroonist. Peale selle on teise ritta kontrollina lisatud seerumivabas söötmes inkubeeritud PF14-pDNA kompleksid, kus ei esine eristatavaid bände.

SDS geelilt tuleb iga seerumiga selgelt välja 70 kDa bänd, mis on tõenäoliselt seerum albumiin, mis mass-spektromeetria tulemuste järgi oli igas seerumis tugevalt esindatud. Kuna seerumiga inkubatsiooni aeg oli võrdlemisi lühike (30 minutit), ei ole püsiv kroon veel lõplikult jõudnud moodustuda (Monopoli *et al.*, 2011) ning see selgitab ka, miks seerum albumiin on iga seerumi kontsentratsiooni juures kõrgelt esindatud. Lisaks on kõigis seerumites suuresti esindatud ka serotransferriin (77 kDa), mis molekulmassi järgi võiks samuti vastata antud valgubändile.

100% veise seerumi kontsentratsiooni juures on veel näha kahte õrna bändi 60 kDa juures ja 90 kDa juures. 90 kDa juures olev bänd võib vastata näiteks inter-alfa-trüpsiini inhibiitor H3 raskele

ahelale (99 kDa), gelsoliinile (85 kDa) või komplemendi faktor B-le (85 kDa). 60 kDa bänd võib olla mõni keratiini tüüp (60-65 kDa), mida leidus veise seerumi kroonis suurel hulgal. Kuna veise seerumis enim esindatud 35 valgu hulgas (Lisa 1 tabel 1) on paljud valgud molekulmassiga 65-80 kDa, võib see ka seletada, miks veise seerumist tuvastati vähem valgubände kui inimese või hiire seerumist.

Inimese seerumis esinevad bändid veel 100, 90 ja 50 kDa juures. 100 kDa bänd võib olla kas inter-alfa-trüpsiini inhibiitor (raske ahel 2 või 4) või komplemendi komponent C6. Nagu veise seerumi puhulgi, vastab 90 kDa bänd tõenäoliselt gelsoliinile. 50 kDa bändile vastavaid valke võib olla mitmeid, näiteks haptoglobiin, hemopeksiin, vitamiin D siduv valk, vitronektiin, Ig mu ahela C piirkond või alfa-1-antitrüpsiin. Detekteeritav on ka õrn 40 kDa bänd, mis on tõenäoliselt mõni Ig gamma või alfa ahel.

Hiire seerumis leidus võrreldes teiste seerumitega kõige rohkem bände. Samuti leidus hiire seerumis mitmeid suure molekulmassiga bände, mis ei olnud tuvastatavad ei veise ega inimese seerumis. Hiire seerumist leitud bändid: 200; 180; 150; 100; 90 ja 60 kDa. Kõige suurem bänd on tõenäoliselt fibronektiin, 180 kDa bänd aga komplement C3 valk. Ka 150 kDa juures paiknev bänd on tõenäoliselt mõni komplemendi valk – H või B. Samuti võib see tähistada muriinoglobuliini, mis oli omane just hiire seerumi kroonile. Edasi 100 ja 90 kDa bändile vastab nagu inimese seerumiski inter-alfa-trüpsiini inhibiitorile või näiteks plasminogeenile. 60 kDa bänd tähistab ilmselt jällegi komplemendi valke- C9, C8 või komplemendi faktor I.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas ja millist mõju avaldab erinevates seerumites nanopartiklite ümber moodustunud valgu kroon SR-A3 ja SR-A5 püüduretseptorite pinnaletoomisele. Teiseks eesmärgiks oli kirjeldada PF14-pDNA partiklite ümber moodustuva valgu krooni koostist erinevates seerumites. Lisaks selgitada, millised biokrooni valgud võiksid indutseerida või inhibeerida PF14-SCO nanopartiklite seondumist rakkudega ja sisenemist rakku püüduretseptorite vahendusel.

Hiljuti on meie töögrupp näidanud, et SR-A3 ja SR-A5 retseptorid ei ole pidevalt rakkude pinnal olemas, vaid tuuakse sinna alles nende indutseerimisel nanokompleksidega (Juks *et al.*, 2015). Käesoleva töö eesmärgiks oli edasi uurida, kas erinevad seerumid võiksid mõjutada SR-A3 ja SR-A5 retseptorite pinnaletoomist. Kui võrrelda erinevate seerumite mõju SR-A3 retseptorite pinnale

indutseerimisele, siis oli kõige suurem mõju veise ja inimese seerumil. Hiire seerumis moodustunud valgu krooni mõju nii SR-A3 kui ka SR-A5 retseptorite pinnale toomisel oli kõige tagasihoidlikum. Kui vaadata seerumivabas söötmed inkubeeritud rakke, siis kompleksid küll indutseerisid oluliselt SR-A3 pinnaletulekut, kuid palju väiksemal määral kui veise ja inimese seerumis. SR-A5 retseptori hulk oli aga seerumivabas söötmes samal tasemel inimese seerumiga, olles väiksem kui veise seerumiga söötmes.

Lisaks vaatlesime ka komplekside seondumist HeLa pLuc rakkudega erinevates seerumites. Need tulemused vastasid suuresti SR-A retseptorite üldisele hulgale rakkude pinnal – kõige enam seondusid kompleksid rakkudega veise seerumiga söötmes ning kõige vähem hiire seerumiga söötmes. Mõnevõrra üllatuslikult seondus inimese seerumiga söötmes rakkudega aga märgatavalt vähem partikleid kui veise seerumiga söötmes. Partiklite seondumine rakkudega inimese seerumiga söötmes oli ligikaudu samal tasemel kui seerumivabas söötmes.

Kuigi varasemalt on näidatud, et seerumi valkudel võib olla soodustav mõju partiklite sisenemisele rakku (Ritz *et al.*, 2015; Mortimer *et al.*, 2014), on ka vastupidiseid tulemusi, kus näidatakse, et partiklid sisenevad rakkudesse kõige efektiivsemalt seerumivabas keskkonnas (Lesniak *et al.*, 2012). Seerumivaba keskkond võib soodustada partiklite seondumist retseptoritele, kuna puuduvad seondumist inhibeerivad valgud, nagu näiteks komplement C3 (Walkey *et al.*, 2014). Samuti adsorbeerivad seerumivabas söötmes inkubeeritud partiklid enda külge valgud, mis on lähedal raku plasmamembraanile ning rakkude kahjustamise tõttu ka mõned tsütosoolsed valgud. See põhjustab mõjusamat interaktsiooni raku plasmamembraaniga ning ka raku membraanide suuremat lõhkumist (Lesniak *et al.*, 2012). Lisaks võivad seerumivabas söötmes SR-A3 pinnaletulekut indutseerida halvenenud keskkonnatingimused. Kuna SR-A3 on tuntud ka CSR (*cellular stress response* ehk rakulise stressi vastus) nime all, siis võib see olla üks põhjus, miks toitaineteväheses keskkonnas on SR-A3 retseptorid rohkem pinnal. Ka SR-A5 puhul võib ferritiini vähesus soodustada retseptorite translokatsiooni raku pinnale.

Kui vaadata valgu krooni valkude suuruse järgi, siis selgub, et seondusid pigem väikesed valgud, molekulmassiga kuni 70 kDa. Kõige vähem seondusid partiklitega molekulmassilt suuremad kui 300 kDa valgud. Ka Pozzi ja teised näitasid sarnast trendi oma artiklis (Pozzi *et al.*, 2015a). Samuti olid suuruse järgi valgud eri seerumitega söötmes jaotunud võrdlemisi ühtlaselt. Ainsaks peamiseks erinevuseks oli veise seerumiga söötmes esinenud alla 20 kDa valkude väike hulk.

Valkude hulka, mis on partiklitele seondunud, on kirjeldanud Walkey ja Chan, kes koostasid 125 valgust koosneva adsorbaadi, mis on kogutud erinevatest katsetest. Seal on välja toodud ka valgud, mis moodustavad vähemalt ühe katse valkudest enam kui 10% (Walkey ja Chan, 2012). Mõned nendest valkudest olid suurem määral esindatud ka selle töö mass-spektromeetria tulemustes. Näiteks seerum albumiin, transferriin ja komplement C3, mis olid esindatud kõikide seerumite biokroonis.

Analüüsides biokrooni koostist valkude funktsiooni järgi, moodustasid neist suurema osa erinevad komplemendi valgud, immunoglobuliinid, lipoproteiinid, koagulatsioonivalgud, koelekkevalgud ja akuutse faasi valgud. Inimese seerumi kroonist moodustavad kõige suurema osa ehk ligi 20% immunoglobuliinid, mis korreleerub varasemalt esitatud tulemustega. Hiire seerumiga söötmes on immunoglobuliinide osakaal veidi väiksem kui varasemalt tähendatud (Pozzi *et al.*, 2015a). Veise seerumiga söötimest tuvastati aga ainult üks immunoglobuliin. Kuna immunoglobuliinid on suured valgud, võivad need sarnaselt komplement C3 valgule (Walkey *et al.*, 2014) blokeerida nanopartikli sisenemiseks vajaliku retseptori. See võib aga selgitada, miks veise seerumiga söötmes inkubeeritud partiklid seondusid rakkudega suuremal hulgal. Lisaks tuleb nende valkude suurt hulka silmas pidada *in vivo* katsete juures, kuna immunoglobuliinid ja komplemendi valgud kuuluvad opsoniinide hulka. Opsoniinide seondumine partiklitele muudab nanopartiklid makrofaagide märklauaks, sest makrofaagide pinnal on mitmeid retseptoreid nii komplemendi faktorite kui ka immunoglobuliinidel äratundmiseks. Seega võivad immunoglobuliinid ja komplemendi faktorid nanopartiklitele seondudes põhjustada bioaktiivsete ainete kiiret kõrvaldamist ringlusest (Pozzi *et al.*, 2014). Immunoglobuliinid ja komplemendi valgud põhjustavad retseptor-vahendatud fagotsütoosi teel ka immuunvastuse teket (Nel *et al.*, 2009).

Üks põhjustest, miks näiteks komplement C3 võib inhibeerida partiklite sisenemist rakku, on selle valgu suurus. Üha enam on hakatud nanopartiklite pinda funktsionaliseerima mõne ligandiga, mille tunneb ära kindel rakupinna retseptor ning selline disain võimaldab suunatud transporti kindlasse kohta. Komplement C3 võib aga oma suuruse tõttu maskeerida retseptorile seondumiseks vajaliku ligandi (Walkey *et al.*, 2014). Kui vaadata enim levinud valke kõikides seerumites (Lisa 1), on seal ka kõikides seerumi kroonides esindatud komplement C3. Ka komplemendi valkude hulk on võrreldav varasemate tulemustega (Pozzi *et al.*, 2015a).

Lisaks immunoglobuliinidele ja komplemendi valkudele on oluliseks vereplasma valkude rühmaks ka lipoproteiinid, mille hulka kuuluvad ka apolipoproteiinid. Apolipoproteiinide funktsiooniks organismis on mitmete lipiidide transport, olles osaks lipoproteiinide partiklitest. Nad on ka olulised ensüümide kofaktorid ning on ligandideks mitmetele retseptoritele (Saito *et al.*, 2004). Lipoproteiine, sealhulgas apolipoproteiine, tunnevad organismis ära mitmed retseptorid, näiteks LDL (*low density lipoprotein*) ja VLDL (*very low density lipoprotein*) retseptorid (Willnow *et al.*, 1999). LDL retseptorid on võimelised ära tundma näiteks ApoE ja ApoB100. Lisaks nendele retseptoritele on näidatud, et ka klass B püüdurretseptorid võivad siduda mitmeid apolipoproteiine, mis kuuluvad HDLide (*high density lipoprotein*) koostisesse (Pozzi *et al.*, 2014). Tänu püüdurretseptoritega sarnastele ligandidele on võimalik, et neid apolipoproteiine tunnevad ära ka klass A püüdurretseptorid. Seetõttu võivad ApoE ja ApoB100 osaleda ka SR-A3 retseptori pinnale toomises. Lisaks saaksid LDL ja VLDL retseptorid töötada koos SR-A3 retseptoriga, aidates kaasa SR-A3 retseptorite translokatsioonile raku pinnale ja ka partiklite transpordile rakku.

Peale eelnevalt nimetatule on veel teisigi apolipoproteiine, mis olles valgu krooni koostisosaks, võivad kaasa aidata partiklite sisenemisele rakku. Näiteks ApoH aitab kaasa polüsteriini partiklite sisenemisele HeLa rakkudesse ja mesenhümaalsetesse rakkudesse (Ritz *et al.*, 2015) ning ApoA1 aitab kaasa katioonsete liposoomide sisenemisel maksarakkudesse (Kim *et al.*, 2009). Teisest küljest võivad apolipoproteiinid partiklite sisenemist rakkudesse ka inhibeerida. Näiteks ApoC3 ja ApoA4 inhibeerisid polüsteriini nanopartiklite sisenemist rakkudesse (Ritz *et al.*, 2015). Kuigi võrreldes varasemate tulemustega (Ritz *et al.*, 2015; Tenzer *et al.*, 2011; Pozzi *et al.*, 2015a) oli inimese ning hiire seerumiga söötmes oluliselt vähem lipoproteiine, leidis neis eelpool nimetatud apolipoproteiine. Näiteks inimese seerumiga söötmes leidis suurel hulgal ApoH ja ApoB100 valke, veise seerumiga söötmes aga ApoE ja ApoH, mis võiksid seletada ka SR-A3 ja SR-A5 kõrgemat taset nende seerumitega proovides. Ka hiire seerumiga söötmes leidis ApoE ja ApoA1, kuid seal leidis ka ApoC3 ja ApoA4, mis võib inhibeerida partiklite sisenemist rakkudesse. Kuigi ApoC3 leidis ka veise seerumiga söötmes, tuvastati seda suuremal hulgal hiire seerumi kroonist.

Peale eelpool mainitud valkude on oluliseks biokrooni koostises olevaks valkude rühmaks ka koelekked valgud. Vereplasmas leiduvad koelekked valgud on tavapärased normaalsetes rakkudes, kuid väljaspool rakke võivad olla märgiks koe kahjustustest (Anderson ja Anderson, 2002). Koelekked valkude hulk valgu kroonis korreleerub varasemate tulemustega, moodustades 5% kogu adsorbaadist (Pozzi *et al.*, 2015a; Ritz *et al.*, 2015). Nende valkude hulka kuulub ka näiteks

vitronektiin, mille puhul on näidatud DOTAP (1,2-dioleoüül-3-trimetüülammoonium propaan) partiklite suuremat sisenemist vähirakkudesse. Vitronektiini retseptoriks rakkude pinnal on $\alpha\beta3$ integriini retseptorid, mis on üleekspresseeritud paljudes kasvajates (Caracciolo *et al.*, 2013). Ka veise, inimese ja hiire seerumiga söötmes seondus PF14-SCO nanopartiklitega palju vitronektiini, mistõttu võib see soodustada PF14-SCO komplekside seondumist rakkudega ning sisenemist rakkudesse. Lisaks on $\alpha\beta3$ integriini retseptorid ekspresseeritud ka HeLa rakkude pinnal (Bai *et al.*, 1994), mistõttu on võimalik, et $\alpha\beta3$ integriini retseptor on koretseptoriks SR-A retseptoritele ning võimaldab tõhusamat partiklite seondumist ja sisenemist.

Mass-spektromeetria tulemused näitasid ka, et kõigis seerumites oli kõige rohkem esindatud seerum albumiin. Mitmed uurimustööd on näidatud, et natiivne seerum albumiin ei ole ligandiks SR-A retseptoritele, kuid seondudes nii nanopoorsete polümeersete partiklitega kui ka kihiliste räni nanopartiklitega, muutub albumiini konformatsioon, ning sellisel kujul on võimelised SR-A retseptorid albumiini siduma (Yan *et al.*, 2013; Mortimer *et al.*, 2014). See võib olla ka üks põhjus, miks inimese ja veise seerumiga söötmes indutseerisid PF14-SCO nanopartiklid SR-A3 ja SR-A5 retseptoreid rakkude pinnale suuremal määral kui seerumvabas keskkonnas. Samas ei seleta see, miks hiire seerumiga söötmes moodustunud biokroon ei avaldanud samasugust mõju retseptorite translokatsioonile kui veise ja inimese seerum.

Lisaks seerum albumiinile võib SR-A3 ja SR-A5 retseptoreid pinnale indutseerida ka fetuiin, mis oli kõikides seerumite biokroonis esindatud suurel hulgal. Mõni aasta tagasi on näidatud, et HeLa rakkude inkubeerimisel fetuiini sisaldavas söötmes, kasvab PF14-SCO nanopartiklite splaissingu parandamise efektiivsus (Ezzat *et al.*, 2012). Lisaks soodustab fetuiin endotsütoosi ning võib olla ka opsoniiniks (www.uniprot.org). Fetuiin A ehk alfa-2-HS-glükoproteiin oli esindatud suurel määral kõikides seerumites. Fetuiin B oli olemas ka veise seerumiga söötmes. Just fetuiini esinemine ning selle hulk kroonis võib seletada, miks veise seerumiga söötmes olevad partiklid seondusid rakkudega kõige rohkem ning miks oli veise seerumiga söötmes inkubeeritud rakkudel kõige suuremal hulgal SR-A retseptoreid.

Inimese ja hiire seerumi valkudest on oluline alfa-1-antitrüpsiin, millel on põletikuvastane toime. See valk on oluline krooni koostises, kuna nii õnnestuks vältida makrofaagide kogunemist partiklite lähedale ning seeläbi makrofaagide vahendatud partiklite elimineerimist (Pozzi *et al.*, 2015b). Lisaks takistab alfa-1-antitrüpsiin kopsu endoteelirakkudes apoptoosi ning on näidatud, et see valk siseneb rakkudesse klatriin-sõltuvat mehhanismi kasutades (Sohrab *et al.*, 2009). Olles

võimeline rakkudesse sisenema, võib alfa-1-antitrüpsiin aidata kaasa ka partiklite seondumisele ning sisenemisele rakku. Selle valgu analoogiks veisel on alfa-1-antiproteinaas, mis on samuti seriini proteaasi inhibiitor (www.uniprot.org) ning oli veise seerumi kroonis rohkelt esindatud.

PF14-pDNA biokrooni koostises on ka valk, mis võiks soodustada nanopartiklite interaktsiooni rakumembraaniga. Nimelt inter-alfa-trüpsiini inhibiitori raske ahel 3, mis seob olulist membraani komponenti – hüaluroonhapet (Pozzi *et al.*, 2015b). Hüaluroonhape on oluline rakuvälise maatriksi komponent ning seda leidub palju sidekoes (Laurent ja Fraser, 1992). Seetõttu võib krooni koostises olev hüaluroonhapet siduv valk soodustada nanopartikli seondumist plasmamembraaniga (Pozzi *et al.*, 2015b). Ka Walkey ja kolleegid on membraaniga interakteerumisel oluliseks pidanud just erinevaid hüaluroonhapet siduvaid krooni valke. Lisaks on esile toodud ka rasked ahelad 1 ja 2 (Walkey *et al.*, 2014). Inter-alfa-trüpsiini inhibiitori rasked ahelad 1, 2 ja 3 olid esindatud kõikide seerumite biokroonis, kuid sellel valgul ei ole sama toime kõikide seerumite korral. Konfokaalmikroskoopia tulemuste põhjal selgus, et hiire seerumiga söötmes interakteerus rakkudega vähem nanopartikleid kui inimese või veise seerumit sisaldavas söötmes. Seega, lisaks inter-alfa-trüpsiini inhibiitorile on olulised ka muud valgud või valkude kombinatsioon, mis soodustavad või inhibeerivad nanopartiklite seondumist rakkudega. Ka mõned teised inter-alfa-trüpsiini inhibiitori rasked ahelad, näiteks H4, olid tuvastavad kõikides seerumites.

Üheks oluliseks valguks võib olla ka transferriin, mida on kasutatud spetsiifilise märklauana partiklite transpordiks rakkudesse. On näidatud, et partiklid, millele on adsorbeerunud transferriin, on sisenenud edukalt rakkudesse (Bargheer *et al.*, 2015). Samas võivad seerumivalgud takistada retseptor-spetsiifilist sisenemist, kui kasutada transferriiniga eelnevalt kaetud partikleid (Salvati *et al.*, 2013). Sellegipoolest on võimalik, et transferriin soodustab partiklite sisenemist rakku, kuna transferriin on oluline raua transpordiks (www.uniprot.org). Samuti on võimalik, et ferritiini transport SR-A5 vahendusel toimub transferriinist sõltuvalt (Li *et al.*, 2009). Seetõttu võib transferriin olla üks valkudest, mis mõjutab ka SR-A5 pinnaletulekut. Serotransferriin oli suurel hulgal esindatud kõikides seerumites, kuid neist kõige väiksemal määral veise seerumiga söötmes, mistõttu on selle võime mõjutada just SR-A5 retseptorite pinnaletulekut küsitav, kuna just veise seerumiga söötmes oli SR-A5 retseptorite tase kõige kõrgem.

On teada, et valgu krooni koostis võib lisaks seerumi päritolule sõltuda ka selle kontsentratsioonist. Uurides PF14-SCO nanopartiklite külge jäävaid vereplasma valke erinevatel seerumi kontsentratsioonidel, selgusid mitmed erinevused. Mida kõrgem oli seerumi kontsentratsioon, seda

enam erinevaid valke oli võimalik geel-elektroforeesiga tuvastada. Ka Monopoli koos kolleegidega on näidanud valgu krooni koostise erinevust seerumi erinevatel kontsentratsioonidel (Monopoli *et al.*, 2011). Need erinevused võivad tuleneda erinevate valkude eri afiinsusest partiklite suhtes ja nende konkureeriva seondumise tõttu. Kõrgema seerumi kontsentratsiooni juures saavad seonduda ka need valgud, mille hulk seerumis madalama kontsentratsiooni juures on väiksem, kuid millel on kõrgem afiinsus partiklite suhtes. Kõrgema kontsentratsiooni juures on nende hulk seerumis suurem ning nad saavad konkureerida plasmas rohkelt esinevate, kuid partikli suhtes nõrga afiinsusega valkudega. Samas artiklis näidati ka, et püsiv kroon moodustub ühe tunni jooksul, pärast seda biokroon enam ei muutu ning konkureeriv valkude seondumine on saavutanud tasakaalulise oleku (Monopoli *et al.*, 2011). Käesolevas töös läbiviidud SDS-geelelektroforeesi ja ka mass-spektromeetria katses inkubeeriti partikleid kolmkümmend minutit, mis tähendab, et stabiilne kroon polnud veel moodustunud ning tulemused võivad erineda artiklis esitatud tulemustest.

Monopoli ja teised näitasid, et madalamal kontsentratsioonil seonduvad pigem valgud molekulmassiga 90 kDa ja 26 kDa ning kõrgemal kontsentratsioonil seonduvad 50–70 kDa suurused valgud (Monopoli *et al.*, 2011). Need tulemused näitavad valkude jaotust inimese plasmas, mistõttu võivad need tulemused mõnevõrra erineda selles töös esitatud tulemustest. Samas näidati, et seerum albumiini, fibrinogeeni ja immunoglobuliine leidis plasmas suurel hulgal ning samuti olid need kõrgel tasemel esindatud iga kontsentratsiooni juures (Monopoli *et al.*, 2011). Need tulemused korreleeruvad ka meie katsete tulemustega, kus inimese seerumi bändidest olid seerum albumiin ja fibrinogeen tugevasti esindatud.

Kui võrrelda erinevates seerumites moodustunud krooni mõju SR-A3 ja SR-A5 retseptorite pinnale toomisel, siis on näha, et kõige suurem mõju on veise ja inimese seerumil. Veise seerumi komponendid, mis võivad selgitada selle suurt edukust SR-A retseptorite pinnale toomisel, on fetuiinid ning seerum albumiin, millel mõlemal on täheldatud suurt rolli SR-A retseptorite translokatsioonile raku pinnal. Seerum albumiini mõju partiklitele on selgitatud täpsemalt vaid veise seerumi kohta (Yan *et al.*, 2013; Mortimer *et al.*, 2014), mistõttu on alust arvata, et muutunud konformatsiooniga seerum albumiinil oli suurim mõju just veise seerumiga söötmes. Samuti oli tõenäoliselt fetuiini roll SR-A retseptorite pinnale indutseerimises kõige suurem just veise seerumiga söötmes, kuna seal leidis seda kõige suuremal hulgal. Lisaks leidis veise seerumiga

söötmes kõige suuremal hulgal inter alfa trüpsiini inhibiitori rasket ahelat 3, millel võib olla oluline mõju partiklite interaktsioonil rakkudega.

Ka inimese seerumiga söötmes inkubeeritud partiklid näitasid suurt võimet SR-A retseptoreid pinnale indutseerida. Mitmed apolipoproteiinid, mis on olnud olulised tegurid SR-A retseptorite pinnale indutseerimisel, olid kõige suuremal hulgal esindatud just inimese seerumi biokroonis. Sellisteks apolipoproteiinideks on näiteks ApoB100, ApoH ja ApoA1. Lisaks olid inimese seerumiga söötmes enim esindatud ka mitmed teised valgud, millel võiks olla SR-A retseptoreid pinnale indutseeriv või partiklite rakku sisenemist soodustav toime. Sellisteks valkudeks on näiteks inter alfa trüpsiini inhibiitori rasked ahelad 1 ja 2 ning vitronektiin.

Kõige vähem soodustas SR-A retseptorite pinnaletulekut ning partiklite seondumist rakkudega hiire seerum. Kui uurida lähemalt hiire seerumi valkude koostist, leidub seal mitmeid valke, mis peaksid soodustama partiklite seondumist ja SR-A retseptorite pinnale indutseerimist. Kõik valgud, mis võiksid soodustada nanopartiklite sisenemist või seondumist rakkudega, on hiire seerumiga söötmes küll esindatud, kuid vähemal määral kui inimese või veise seerumiga söötmes. Soodustava toimega valkudest oli hiire seerumiga söötmes enim esindatud vaid ApoE. Komplement C3, millel arvatakse olevat inhibeeriv toime partiklite seondumisel rakkudele, leidis kõige enam inimese mitte hiire seerumi biokroonis. Samas leidis hiire seerumiga söötmes kõige enam ApoA4 ja ApoC3 valke, millel on samuti näidatud inhibeerivat toimet partiklite rakku sisenemisel (Ritz *et al.*, 2015).

Käesoleva bakalaureusetöö tulemuste kokkuvõtteks võib öelda, et seerumis moodustunud valgu kroonil on oluline roll partiklite sidumisel rakkudele ning SR-A retseptorite eksponeerumisel raku pinnal. Tuvastati mitmeid valke, mis võivad nii indutseerida kui ka inibeerida partiklite seondumist ning rakkudesse sisenemist.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti erinevate seerumite mõju PF14-SCO nanopartiklite sisenemisele rakku ning selle mõju SR-A3 ja SR-A5 retseptorite pinnale toomisel.

Käesoleva töö tulemused näitasid selgelt, et seerumi valgud mõjutavad SR-A3 ja SR-A5 retseptorite pinnale indutseerimist. Oluline roll oli ka seerumi tüübil, kuna kõik seerumid ei avaldanud samasugust mõju. Kõige rohkem soodustasid retseptorite translokatsiooni inimese ja veise seerum, hiire seerum ning seerumivaba sööde tunduvalt vähem.

Lisaks tahtsime välja selgitada, millised krooni valgud võiksid mõjutada retseptorite pinnale tulemist. Selleks uurisime inimese, hiire ja veise seerumiga söötmes moodustunud valgu krooni mass-spektromeetriliselt. Retseptorite pinnaletulekut ja partiklite seondumist rakkudele võiksid soodustada mitmed valgud, sealhulgas seerum albumiin, fetuiin, inter-alfa-trüpsiini inhibiitor, alfa-1-antitrüpsiin ja vitronektiin. Indutseerivate valkude hulgas on veel mitmeid apolipoproteiine, mis võiksid olla ligandiks SR-A3 retseptorile, kuna seonduvad samuti HDL ja VLDL partiklitele. Samuti on valgu krooni valkude hulgas ka mõningaid valke, mis võiksid inhibeerida retseptorite pinnaletulekut ja partiklite seondumist rakkudele. Selliseks valguks on näiteks komplemendi faktor C3, mis takistab oma suuruse tõttu interaktsioone partikli ja rakumembraani vahel, ning ka ApoC3 ja ApoA4.

Võrreldes eri seerumite koostist ning valgu krooni mõju partiklite sisenemisele ja SR-A retseptorite eksponeerimisele raku pinnal, võib teha järeldusi, millised konkreetset valgud igas kroonis mõjutasid enim partiklite seondumist SR-A retseptorite ja raku plasmamebraaniga. Veise seerumiga söötmes olid nendeks valkudeks tõenäoliselt seerum albumiin ja fetuiin, mida leidis selle seerumi biokroonis suuremal hulgal võrreldes teiste biokroonidega. Inimese seerumiga söötmes aga leidis võrreldes teiste seerumite krooniga kõige suuremal hulgal indutseerivaid valke, näiteks ApoB100, ApoH ja vitronektiin. Hiire seerumiga söötmes inkubeeritud nanopartiklite ebaefektiivse seondumise rakkudega ning vähese SR-A retseptorite hulga taga võib olla inhibeerivate valkude ApoA4 ja ApoC3 kõrge esindatus valgu kroonis. Samuti oli hiire seerumiga söötmes võrreldes veise ja inimese seerumiga vähemal määral indutseerivaid valke. Seerumivabas söötmes inkubeeritud partiklite edu hiire seerumi ees võib seisneda aga inhibeerivate valkude puudumises. Lisaks võivad seerumivabas söötmes partiklid kahjustada rakumembraani ning halvenenud keskkonnatingimused võivad samuti soodustada SR-A retseptorite translokatsiooni.

The role of protein corona on the SR-A3 and SR-A5 receptor mediated uptake of PF14-SCO complexes

Rahel Paloots

SUMMARY

The aim of this thesis was to study the role of PF14-SCO nanoparticle protein corona on the translocation of SR-A3 and SR-A5 receptors on the cell surface. For this reason, confocal microscopy was used to examine the SR-A3 and SR-A5 receptors on the cell surface. Also, SDS-PAGE and mass-spectrometry experiments were carried out to observe the composition of protein corona formed in mouse, human and bovine serum.

When developing nanoparticles, protein corona is an important factor to bear in mind. Protein corona forms around nanoparticles in biological environment. It strongly affects the properties of nanoparticles as well as the cellular uptake and toxicity of the particles. Protein corona can also mediate the interaction of particles with various receptors such as scavenger receptors. Therefore, protein corona is highly relevant for developing efficient drug delivery vehicles.

The results of this thesis suggest that various serums indeed affect the cellular uptake of the particles. We confirmed the previous results that state that SR-A receptors are not presented on the cell surface of untreated cells and after incubation with the PF14-oligonucleotide particles the presence of SR-A3 and SR-A5 on the cell surface was detected. We showed that bovine and human serum induced the translocation of scavenger receptors the most in comparison to mouse serum or serum free medium.

To observe which proteins in biocorona affected the uptake of the particles and the interactions with SR-A3 and SR-A5 receptors on the cell surface, mass-spectrometry was carried out. Some proteins that might have a positive effect on the uptake were identified, such as ApoH, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains 1, 2 and 3 and alfa-1-antitrypsin. ApoE, ApoB100, serum albumin and fetuin might be responsible for the upregulation of SR-A receptors. Also, some proteins, such as Complement C3, ApoA4 and ApoC3 might inhibit the internalization of particles.

In addition to that, we tried to narrow down the single proteins in the corona responsible for the cellular uptake and SR-A receptor induction in each serum corona. We suggest that in bovine serum, fetuin and serum albumin are the most important proteins that induce the internalization of

the particles as well as the translocation of SR-A3 and SR-A5 receptors on the cell membrane. Also, we assume, that the reason for unsuccessful uptake of the particles and expression of SR-A receptors in mouse serum is due to inhibitory proteins such as ApoA4 and ApoC3. As for human serum, many proteins could be in charge of the uptake and expression of SR-A receptors. Moreover, the most proteins that have a conducive effect were present in the largest extent in human serum, such as ApoH, ApoB100, vitronectin etc.

TÄNUAVALDUSED

Soovin siiralt tänada oma juhendajaid Carmen Juksi ja Margus Poogat nende suure abivalmiduse ja kannatlikkuse eest. Samuti sooviksin tänada oma sõpru ja perekonda abi ning toetuse eest!

KIRJANDUSE LOETELU

Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A. and McNeil, S.E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 61(6): 428–437.

Anderson, N.L. and Anderson, N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 1(11): 845–867.

Arukuusk, P., Parnaste, L., Margus, H., Eriksson, J.N.K., Vasconcelos, L., Padari, K., Pooga, M. and Langel, Ü. (2013). Differential endosomal pathways for radically modified peptide vectors. *Bioconjug Chem.* 24: 1721–1732.

Aubin-Tam, M.E. and Hamad-Schifferli, K. (2005). Gold nanoparticle-cytochrome C complexes: the effect of nanoparticle ligand charge on protein structure. *Langmuir.* 21(26): 12080–12084.

Bai, M., Campisi, L. and Freimuth, P. (1994). Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A549 cells by adenovirus type 12 but not by adenovirus type 2. *J Virol.* 68(9): 5925–32.

Bargheer, D., Nielsen, J., Gébel, G., Heine, M., Salmen, S.C., Stauber, R., Weller, H., Heeren, J. and Nielsen, P. (2015). The fate of a designed protein corona on nanoparticles in vitro and in vivo. *Beilstein J Nanotechnol.* 6: 36–46.

Boisguérin, P., Deshayes, S., Gait J.M., O'Donovan, L., Godfrey, C., Betts A.C., Wood, J.A.M. and Lebleu, B. (2015). Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev.* 87: 52–67.

Canton, J., Neculai, D. and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13: 621-634.

Caracciolo, G., Cardarelli, F., Pozzi, D., Salomone, F., Maccari, G., Bardi, G., Capriotti, L.A., Cavaliere, C., Papi, M. and Lagana, A. (2013). Selective targeting capability acquired with a protein corona adsorbed on the surface of 1,2-dioleoyl-3 trimethylammonium propane/DNA nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 5(24): 13171–13179.

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A. and Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify

exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(7): 2050–2055.

Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 269: 10444–10450.

DeWitte-Orr, S.J., Collins, S.E., Bauer, C.M., Bowdish, D.M. and Mossman, K.L. (2010). An accessory to the 'Trinity': SR-As are essential pathogen sensors of extracellular dsRNA, mediating entry and leading to subsequent type I IFN responses. *PLoS Pathog*. 6(3): e1000829.

Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., Knauer, S.K. and Stauber, R.H. (2015). The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chem Soc Rev*. 44(17): 6094–6121.

EL Andaloussi, S., Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I.I., Simonson, O.E., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, D.M., Kurrikoff, K., Viola, J.R., Zaghoul, E.M., Sillard, R., Johansson, H.J., Hassane, F.S., Guterstam, P., Suhorutshenko, J., Moreno, P.M.D., Oskolkov, N., Hälldin, J., Tedebark, U., Metspalu, A., Lebleu, B., Lehtiö, J., Smith, C.I.E. and Langel, Ü. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically *in vivo*. *Nucleic Acids Res*. 39(9): 3972–3987.

Ezzat, K., EL Andaloussi, S., Zaghoul, E.M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P.M.D., Viola, J.R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., Sillard, R., Hammond, S.M., Wood, M.J.A., Arzumanov, A.A., Gait, M.J., Smith, C.I.E., Hällbrink, M. and Langel, Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res*. 39(12): 5284–5298.

Fogelman, A.M., Haberland, M.E., Seager, J., Hokom, M. and Edwards, P.A. (1981). Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J Lipid Res*. 22(7): 1131–1141.

Frankel, A.D. and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 55: 1189–1193.

- Futaki, S., Ohashi, W., Suzuki, T., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Harashima, H. and Sugiura, Y. (2001). Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug Chem.* 12: 1005–1011.
- Gessner, A., Lieske, A., Paulke, B-R. and Müller, R.H. (2003). Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption. *J Biomed Mater Res.* 65A: 319–326.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophage that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(1): 333–337.
- Han, H-J., Tokino, T. and Nakamura, Y. (1998). CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum Mol Gen.* 7(6): 1039–1046.
- Huang, Y-W., Lee, H-J., Tolliver, L.M. and Aronstam, R.S. (2015). Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges. *Biomed Res Int.* 2015: 834079.
- Jallouk, A.P., Palekar, R.U., Pan, H., Schlesinger, P.H. and Wickline, S.A. (2015). Modifications of natural peptides for nanoparticle and drug design. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 98: 57–91.
- Jiang, Y., Oliver, P., Davies, K.E. and Platt, N. (2006). Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A Scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem.* 281(17): 11834–11845.
- Jiang, X., Weise, S., Hafner, M., Röcker, C., Zhang, F., Parak, W.J. and Nienhaus, G.U. (2010). Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J. R. Soc. Interface.* 7: S5–S13.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. and Prochiantz A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88(5): 1864–1868.
- Juks, C., Padari, K., Margus, H., Kriiska, A., Etverk, I., Arukuusk, P., Koppel, K., Ezzat, K., Langel, Ü. and Pooga, M. (2015). The role of endocytosis in the uptake and intracellular trafficking of PepFect14-nucleic acid nanocomplexes via class a scavenger receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1848(12): 3205–3216.

- Kaplan, I.M., Wadia, J.S. and Dowdy, S.F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*. 102: 247–253.
- Kelley, J.K., Ozment, T.R., Li, C., Schweitzer, J.B. and Williams, D.L. (2014). Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 34(3): 241–261.
- Khalil, I.A., Futaki, S., Niwa, M., Baba, Y., Kaji, N., Kamiya, H. and Harashima, H. (2004). Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylation of octaarginine: enhanced cellular association by hydrophobic core formation. *Gene Ther*. 11: 636–644.
- Kim, S.I., Shin, D., Lee, H., Ahn, B.Y., Yoon, Y. and Kim, M. (2009). Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes. *J Hepatol*. 50(3): 479–488.
- Kuai, R., Yuan, W., Qin, Y., Chen, H., Tang, J., Yuan, M., Zhang, Z. and He, Q. (2010). Efficient delivery of payload into tumor cells in a controlled manner by TAT and thiolytic cleavable PEG co-modified liposomes. *Mol Pharm*. 7(5): 1816–1826.
- Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*. 8: 275–280.
- Langel, Ü. 2006. Handbook of cell-penetrating peptides. Preface. 2nd ed. CRC press, Boca Raton, FL.
- Langel, Ü. 2015. Cell-penetrating peptides. Methods and protocols. p. 4–11. 2nd ed. Humana press, N.Y.
- Laurent, T.C. and Fraser, J.R. (1992). Hyaluronan. *FASEB J*. 6(7): 2397–2404.
- Lehto, T., Castillo Alvarez, A., Gauck, S., Gait, M.J., Coursindel, T., Wood, M.J., Lebleu, B. and Boiguerin, P. (2014). Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in mdx skeletal and cardiac muscle cells. *Nucleic Acids Res*. 42(5): 3207–3217.
- Lesniak, A., Fenaroli, F., Monopoli, M.P., Åberg, C., Dawson, K.A. and Salvati, A. (2012). Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells. *ACS Nano*. 6(7): 5845–5857.

- Li, J.Y., Paragas, N., Ned, R.M., Qiu, A., Viltard, M., Leete, T., Drexler, I.R., Chen, X., Sanna-Cherchi, S., Mohammed, F., Williams, D., Lin, C.S., Schmidt-Ott, K.M., Andrews, N.C. and Barasch, J. (2009). Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell*. 16(1): 35-46.
- Limmon, G.V., Arredouani, M., McCann, K.L., Corn Minor, R.A., Kobzik, L. and Imani, F. (2008). Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *FASEB J*. 22(1): 159–167.
- Lindberg, A., Regberg, J., Eriksson, J., Helmfors, H., Muñoz-Alarcón, A., Srimanee, A., Figueroa, R.A., Hallberg, E., Ezzat, K. and Langel, Ü. (2015). A convergent uptake route for peptide- and polymer-based nucleotide delivery systems. *J Control Release*. 206: 58–66.
- Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, A. and Langel, Ü. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci*. 21(3): 99–103.
- Lindman, S., Lynch, I., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K.A. and Linse, S. (2007). Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Lett*. 7(4): 914–920.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T. and Dawson, K.A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(38): 14265–14270.
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggård, T., Flanagan, M.B., Lynch, I., Elia, G. and Dawson, K. (2011). The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*. 5(9): 7503–7509.
- Maegawa, Y., Mochizuki, S., Miyamoto, N. and Sakurai, K. (2016). Gene silencing using a conjugate comprising Tat peptide and antisense oligonucleotide with phosphorothioate backbones. *Bioorg Med Chem Lett*. 26(4): 1276–1278.
- Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M.A., Cingolani, R. and Pompa, P.P. (2010). Dynamic formation of protein nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*. 4(12): 7481–7491.

- Margus, H., Padari, K. and Pooga, M. (2012). Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. *Mol Ther.* 20(3): 525–533.
- Monopoli, M.P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombelli, F.B. and Dawson, K.A. (2011). Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to *in vitro* and *in vivo* biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 133: 2525–2534.
- Mortimer, G.M., Butcher, N.J., Musumeci, A.W., Deng, Z.J., Martin, D.J. and Minchin, R.F. (2014). Cryptic epitopes of albumin determine mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials. *ACS Nano.* 8(4): 3357–3366.
- Mäe, M., EL Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H.J., Guterstam, P. and Langel, Ü. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release.* 134: 221–227.
- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., V. hoek, E.M., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. and Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater.* 8: 543–557.
- Pae, J. and Pooga, M. (2014). Peptide-mediated delivery: an overview of pathways for efficient internalization. *Ther. Deliv.* 5(11): 1203–1222.
- Patel, P.C., Giljohann, D.A., Daniel, W.L., Zheng, D., Prigodich, A.E. and Mirkin, C.A. (2010). Scavenger receptors mediate cellular uptake of polyvalent oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 21(12): 2250–2256.
- Pearson, A.M., Rich A. and Krieger M. (1993). Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices. *J Biol Chem.* 268(5): 3546–3554.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. and Langel, Ü. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12: 67–77.
- Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., Valkna, A., Saar, K., Rezaei, K., Kahl, U., Hao, J.X., Xu, X.J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Bartfai, T. and Langel, Ü. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 16(9): 857–861.

- Pozzi, D., Caracciolo, G., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Colapicchioni, V., Palchetti, S., Riccioli, A. and Laganà, A. (2014). A proteomics-based methodology to investigate the protein corona effect for targeted drug delivery. *Mol Biosyst.* 10(11): 2815–2819.
- Pozzi, D., Caracciolo, G., Capriotti, A.L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Anchordoquy, T.J. and Laganà, A. (2015). Surface chemistry and serum type both determine the nanoparticle–protein corona. *J Proteomics.* 119: 209–217.
- Pozzi D., Caracciolo G., Digiacomo L., Colapicchioni V., Palchetti S., Capriotti A.L., Cavaliere C., Zenezini Chiozzi R., Puglisi A. and Laganà A. (2015). The biomolecular corona of nanoparticles in circulating biological media. *Nanoscale.* 7(33): 13958–13966.
- PrabhuDas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T.K., Moestrup, S.K., Post, S., Sawamura, T., Silverstein, S., Wang, X-Y. and EL Khoury, J. (2014). Standardizing Scavenger receptor nomenclature. *J Immunol.* 192(5): 1997–2006.
- Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L. and Mahmoudi, M. 2013. Protein-Nanoparticle Interactions. *The Bio-nano interface.* pp 21–34. Springer-Verlag, Berlin.
- Ramsay, E. and Gumbleton, M. (2002). Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential *in-vitro* transfection efficiency. *J Drug Target.* 10(1): 1–9.
- Ramsey, J.D. and Flynn, N.H. (2015). Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol Ther.* 154: 78–86.
- Ritz, S., Schöttler, S., Kotman, N., Baier, G., Musyanovych, A., Kuharev, J., Landfester, K., Schild, H., Jahn, O., Tenzer, S. and Mailänder, V. (2015). Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules.* 16: 1311–1321.
- Saito, H., Lund-Katz, S. and Phillips, M.C. (2004). Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog Lipid Res.* 43(4): 350–380.
- Salvati, A., Pitek, A.S., Monopoli, M.P., Prapainop, K., Bombelli, F.B., Hristov, D.R., Kelly, P.M., Åberg, C., Mahon, E. and Dawson, K.A. (2013). Transferrin-functionalized nanoparticles lose their

targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol.* 8(2): 137–143.

Sohrab, S., Petrusca, D.N., Lockett, A.D., Schweitzer, K.S., Rush, N.I., Gu, Y., Kamocki, K., Garrison, J. and Petrache, I. (2009). Mechanism of alpha-1 antitrypsin endocytosis by lung endothelium. *Faseb J.* 23(9): 3149–3158.

Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R. and Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta.* 1467(1): 165–176.

Srimanee, A., Regberg, J., Hällbrink, M., Vajragupta, O. and Langel, Ü. (2016). Role of scavenger receptors in peptide-based delivery of plasmid DNA across a blood-brain barrier model. *Int J Pharm.* 500(1-2): 128–135.

Stalmans, S., Wynendaele, E., Bracke, N., Gevaert, B., D'Hondt, M., Peremans, K., Burvenich, C. and De Spiegeleer, B. (2013). Chemical-functional diversity in cell-penetrating peptides. *PLoS One.* 8(8): e71752.

Zani, I.A., Stephen, S.L., Mughal, N.A., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S.B. and Ponnambalam, S. (2015). Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells.* 4: 178–201.

Zhu, Z-H., Yu, Y.P., Shi, Y-K., Nelson, J.B. and Luo, J-H. (2009). CSR1 induces cell death through inactivation of CPSF3. *Oncogene.* 28(1): 41–51.

Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Rekik, A., Knauer, S.K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirattanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schild, H. and Stauber, R.H. (2011). Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS Nano.* 5(9): 7155–7167.

Tenzer, S., Docter, D., Kuharev, J., Musyanovych, A., Fetz, V., Hecht, R., Schlenk, F., Fischer, D., Kiouptsi, K., Reinhardt, C., Landfester, K., Schild, H., Maskos, M., Knauer, S.K. and Stauber, R.H. (2013). Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol.* 8(10): 772–781.

- Treuel, L., Docter, D., Maskos, M. and Stauber, R.H. (2015). Protein corona – from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6: 857–873.
- Tönges, L., Lingor, P., Egle, R., Dietz, G.P., Fahr, A. and Bähr, M (2006). Stearylated octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons. *RNA.* 12(7): 1431–1438.
- Walkey, C.D. and Chan, W.C. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev.* 41(7): 2780–2799.
- Walkey, C.D., Olsen, J.B., Song, F., Liu, R., Guo, H., Olsen, D.W., Cohen, Y., Emili, A. and Chan W.C. (2014). Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano.* 8(3): 2439–2455.
- Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S. and Jin, F. (2014). Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J Control Release.* 174: 126–136.
- Wang, Q., Lim, M., Liu, X., Wang, Z. and Chen, K.L. (2016). Influence of solution chemistry and soft protein corona on the interactions of silver nanoparticles with model biological membranes. *Environ Sci Technol.* 50(5): 2301–2309.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L. and Rothbard, J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(24): 13003–13008.
- Westmeier, D., Stauber, R.H. and Docter, D. (2016). The concept of bio-corona in modulating the toxicity of engineered nanomaterials (ENM). *Toxicol Appl Pharmacol.* 299: 53–57.
- Whelan, F.J., Meehan, C.J., Golding, G.B., McConkey, B.J. and Bowdish, D.M.E. (2012). The evolution of the class A scavenger receptors. *BMC Evol Biol.* 12: 227.
- Willnow, T.E., Nykjaer, A. and Herz, J. (1999). Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol.* 1(6): E157–E162.

Vivès, E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 272: 16010–16017.

Vogler, E.A. (2012). Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials.* 33(5): 1201–1237.

Vroman, L. (1962). Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature.* 196: 476–477.

Yan, Y., Gause, K.T., Kamphuis, M.M., Ang, C.S., O'Brien-Simpson, N.M., Lenzo, J.C., Reynolds, E.C., Nice, E.C. and Caruso F. (2013). Differential roles of the protein corona in the cellular uptake of nanoporous polymer particles by monocyte and macrophage cell lines. *ACS Nano.* 7(12): 10960–10970.

Yu, G., Tseng, G.C., Yu, Y.P., Gavel, T., Nelson, J., Wells, A., Michalopoulos, G., Kokkinakis, D. and Luo J.H. (2006). CSR1 suppresses tumor growth and metastasis of prostate cancer. *Am J Pathol.* 168(2): 597–607.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

<http://www.uniprot.org/>

Lisa 1. Mass-spektromeetria valkude tabelid

Tabel 1. Veise seerumiga söötmes enim levinud 35 valku. Valgud on tabelis kahanevas järjekorras esindatuse hulga järgi.

Valgu nimetus	Valgu nimetus (inglise keeles)	Molekulmass (kDa)
Seerum albumiin	Serum albumin	69,293
Alfa-2-HS-glükoproteiin	Alpha-2-HS-glycoprotein	38,418
Apolipoproteiin A2	Apolipoprotein A2	11,202
Apolipoproteiin A1	Apolipoprotein A1	30,276
Alfa-1-antiproteinaas	Alpha-1-antiproteinase	46,103
Serotransferiin	Serotransferrin	77,665
Hemoglobiini subühik alfa	Hemoglobin subunit alpha	15,184
Hemoglobiini looteline subühik beeta	Hemoglobin fetal subunit beta	15,859
Proteaas I prekursor	Protease I precursor Lysyl endopeptidase <i>Achromobacter lyticus</i> .	68,124
Keratiin, tüüp II tsütoskeleti 1	Keratin, type II cytoskeletal 1	66,017
Alfa-2-makroglobuliin	Alpha-2-macroglobulin	167,57
Keratiin, tüüp I tsütoskeleti 10	Keratin, type I cytoskeletal 10	59,51
Inter-alfa-trüpsiini inhibiitori raske ahel H2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	106,16
Fetuiin-B	Fetuin-B	42,663
Alfa-fetoproteiin	Alpha-fetoprotein	68,587
Trüpsiin	Trypsin	24,409
Protrombiin	Prothrombin	70,505
Vitamiin D-siduv valk	Vitamin D-binding protein	53,356
Komplement C3	Complement C3	187,25
Alfa-1-happe glükoproteiin	Alpha-1-acid glycoprotein	23,158
Kininogeen-1	Kininogen-1	68,889

Valk AMBP	Protein AMBP	39,293
Inter-alfa-trüpsiini inhibiitor raske ahel H3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	99,55
Keratiin, tüüp I tsütoskeleti 9	Keratin, type I cytoskeletal 9	62,129
Apolipoproteiin C3	Apolipoprotein C3	10,692
Apolipoproteiin C2	Apolipoprotein C2	11,061
Klusteriin	Clusterin	51,113
Serpiin A3-2	Serpin A3-2	46,236
Apolipoproteiin E	Apolipoprotein E	35,979
Keratiin, tüüp II tsütoskeleti 2 epidermaalne	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,865
Hemopeksiin	Hemopexin	52,209
Aktiin, tsütoplasmaatiline 2	Actin, cytoplasmic 2	41,792
Beeta-2-glükoproteiin 1	Beta-2-glycoprotein 1	38,252
Antitrombiin III	Antithrombin-III	52,44
Serotransferiin	Serotransferrin	77,752

Tabel 2. Inimese seerumiga söötmes enim levinud 35 valku. Valgud on tabelis kahanevas järjekorras esindatuse hulga järgi.

Valgu nimetus	Valgu nimetus (inglise keeles)	Molekulmass (kDa)
Seerum albumiin	Serum albumin	69,366
Alfa-2-makroglobuliin	Alpha-2-macroglobulin	163,29
Serotransferiin	Serotransferrin	77,063
Alfa-1-antitrüpsiin	Alpha-1-antitrypsin	46,736
Haptoglobiin	Haptoglobin	45,205
Apolipoproteiin A1	Apolipoprotein A1	30,777
Komplement C3	Complement C3	187,15
Ig gamma-3 ahel, C piirkond	Ig gamma-3 chain C region	41,287
Ig gamma-1 ahel, C piirkond	Ig gamma-1 chain C region	36,105
Komplement C4B	Complement C4B	192,75

Alfa-1-happe glükoproteiin 1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23,511
Ig kappa ahel C piirkond	Ig kappa chain C region	11,609
Ig alfa-1 ahel C piirkond	Ig alpha-1 chain C region	37,654
Hemopeksiin	Hemopexin	51,676
Ig mu ahel C piirkond	Ig mu chain C region	49,306
Ig lambda-2 ahel C piirkond	Ig lambda-2 chain C regions	11,293
Vitamiin D-siduv valk	Vitamin D-binding protein	52,963
Apolipoproteiin A2	Apolipoprotein A2	11,175
Apolipoproteiin B100	Apolipoprotein B100	515,6
Tseruloplasmiin	Ceruloplasmin	122,2
Ig gamma-2 ahel C piirkond	Ig gamma-2 chain C region	35,9
Alfa-1-antikümotrüpsiin	Alpha-1-antichymotrypsin	23,713
Alfa-1-happe glükoproteiin 2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	23,602
Komplemendi faktor B	Complement factor B	140,94
Alfa-2-HS-glükoproteiin	Alpha-2-HS-glycoprotein	39,324
Transtüretiin	Transthyretin	15,887
Alfa-1B-glükoproteiin	Alpha-1B-glycoprotein	54,253
Komplemendi faktor I	Complement factor I	65,059
Vitronektiin	Vitronectin	54,305
Inter-alfa-trüpsiini inhibiitor raske ahel H2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	105,21
Komplemendi faktor H	Complement factor H	139,09
Hemoglobiini subühik alfa	Hemoglobin subunit alpha	15,257
Beeta-2-glükoproteiin 1	Beta-2-glycoprotein 1	38,298
Hemoglobiini subühik beeta	Hemoglobin subunit beta	15,998
Inter-alfa-trüpsiini inhibiitor raske ahel H4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	99,856

Tabel 3. Hiire seerumiga söötmes enim levinud 35 valku. Valgud on tabelis kahanevas järjekorras esindatuse hulga järgi.

Valgu nimetus	Valgu nimetus (inglise keeles)	Molekulmass (kDa)
Seerum albumiin	Serum albumin	68,692
Hemoglobiini alfa subühik	Hemoglobin subunit alpha	15,112
Apolipoproteiin A1	Apolipoprotein A1	30,615
Serotransferriin	Serotransferrin	76,723
Alfa-2-makroglobuliin	Alpha-2-macroglobulin	165,85
Alfa-1-antitrüpsiin 1-4	Alpha-1-antitrypsin 1-4	45,998
Apolipoproteiin A2	Apolipoprotein A-II	11,309
Seriini proteaasi inhibiitor A3K	Serine protease inhibitor A3K	46,879
Seriini proteaasi inhibiitor A3M	Serine protease inhibitor A3M	47,064
Muriinoglobuliin-1	Murinoglobulin-1	165,3
Alfa-2-HS-glükoproteiin	Alpha-2-HS-glycoprotein	37,325
Apolipoproteiin C2	Apolipoprotein C2	10,741
Hemopeksiin	Hemopexin	51,317
Komplement C3	Complement C3	186,48
Alfa-1-antitrüpsiin 1-2	Alpha-1-antitrypsin 1-2	45,974
Apolipoproteiin A4	Apolipoprotein A-IV	45,029
Alfa-1-antitrüpsiin 1-1	Alpha-1-antitrypsin 1-1	46,002
Vitamiin D-siduv valk	Vitamin D-binding protein	53,6
Transtüretiin	Transthyretin	15,776
Ig gamma-2B ahel, C piirkond	Ig gamma-2B chain C region	36,568
Haptoglobiin	Haptoglobin	38,752
Karboksülestraas 1C	Carboxylesterase 1C	61,055
Alfa-1-antitrüpsiin 1-5	Alpha-1-antitrypsin 1-5	45,891
Seerum amüloid P-komponent	Serum amyloid P-component	26,247
Apolipoproteiin C3	Apolipoprotein C3	10,982

Ig mu ahel C piirkond	Ig mu chain C region secreted form	49,971
Ig gamma-2A ahel C piirkond	Ig gamma-2A chain C region secreted form	36,407
Apolipoproteiin E	Apolipoprotein E	35,866
Tseruloplasmiin	Ceruloplasmin	121,15
Ig kappa ahel C piirkond	Ig kappa chain C region	11,778
Plasminogeen	Plasminogen	90,807
Peamised uriini valgud	Major urinary proteins 11, 6 and 8	17,559
Komplemendi faktor H	Complement factor H	139,14
Alfa-1-antitrüpsiin 1-3	Alpha-1-antitrypsin 1-3	45,823
Ig gamma-1-ahel C piirkond	Ig gamma-1 chain C region	35,633

Tabel 4. Ühised ja unikaalsed valgud inimese, veise ja hiire seerumiga söötmes. Vastav Venni diagramm on toodud tulemuse osas (joonis 9).

Seerum	Valke kokku	Valgud	
Kõik seerumid	7	Komplement C3	Vitamiin D-siduv valk
		Hemopeksiin	Alfa-2-makroglobuliin
		Alfa-2-HS-glükoproteiin	Serotransferriin
		Seerum albumiin	
Inimese seerum ja veise seerum	2	Hemoglobiini subühik alfa	Beeta-2-glükoproteiin 1
Hiire seerum ja veise seerum	3	Apolipoproteiin C3	Apolipoproteiin C2
		Apolipoproteiin E	
Hiire seerum ja inimese seerum	8	Haptoglobiin	Ig kappa ahel C piirkond
		Ig mu ahel C piirkond	Transtüretiin
		Tseruloplasmiin	Komplemendi faktor H
		Apolipoproteiin A1	Apolipoproteiin A2
Veise seerum	22	Aktiin, tsütoplasmaatiline 2	Valk AMBP

		Inter-alfa-trüpsiini inhibiitori raske ahel H2	Keratiin, tüüp II tsütoskeleti 2 epidermaalne
		Apolipoproteiin A2	Apolipoproteiin A1
		Fetuiin-B	Antithrombiin III
		Keratiin, tüüp II tsütoskeleti 1	Alfa-fetoproteiin
		Keratiin, tüüp I tsütoskeleti 9	Protrombiin
		Hemoglobiini looteline subühik beeta	Keratiin, tüüp I tsütoskeleti 10
		Alfa-1-happe glükoproteiin	Klusteriin
		Trüpsiin	Serpiin A3-2
		Proteaas I prekursor	Kininogeen-1
		Alfa-1-antiproteinaas	Inter-alfa-trüpsiini inhibiitor raske ahel H3
Inimese seerum	18	Inter-alfa-trüpsiini inhibiitor raske ahel H2	Inter-alfa-trüpsiini inhibiitor raske ahel H4
		Komplemendi faktor B	Alfa-1-happe glükoproteiin 2
		Ig gamma-3 ahel, C piirkond	Apolipoproteiin B100
		Komplemendi faktor I	Ig gamma-1 ahel, C piirkond
		Alfa-1-antitrüpsiin	Alfa-1-antikümotrüpsiin
		Ig lambda-2 ahel C piirkond	Alfa-1B-glükoproteiin
		Alfa-1-happe glükoproteiin 1	Ig alfa-1 ahel C piirkond
		Hemoglobiini subühik beeta	Komplement C4B
		Vitronektiin	Ig gamma-2 ahel C piirkond

Hiire seerum	17	Alfa-1-antitrüpsiin 1-4	Alfa-1-antitrüpsiin 1-5
		Ig gamma-2B ahel, C piirkond	Seriini proteaasi inhibiitor A3M
		Hemoglobiini alfa subühik	Apolipoproteiin A4
		Alfa-1-antitrüpsiin 1-3	Plasminogeen
		Alfa-1-antitrüpsiin 1-2	Ig gamma-2A ahel C piirkond
		Alfa-1-antitrüpsiin 1-1	Muriinoglobuliin-1
		Seriini proteaasi inhibiitor A3K	Seerum amüloid P-komponent
		Peamised uriini valgud	Ig gamma-1-ahel C piirkond
		Karboksülestraas 1C	

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Rahel Paloots (10.02.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
PF14-oligonukleotiid nanopartiklite interaktsioon vereplasma valkudega ning selle mõju SR-A3 ja SR-A5 retseptorite translokatsioonile raku pinnal,

mille juhendajad on Carmen Juks ja Margus Pooga,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **24.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____ (kuupäev)